



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας**

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

***“Αξιολόγηση υπογλυκαιμικής δράσης φυτικών
ενώσεων με στόχο την παραγωγή ειδικών
διατροφικών προϊόντων για διαβητικούς”***

**ΜΑΡΙΝΑ ΓΙΑΝΝΑΚΗ
Λάρισα, 2016**

***“Αξιολόγηση υπογλυκαιμικής δράσης φυτικών ενώσεων με
στόχο την παραγωγή ειδικών διατροφικών προϊόντων για
διαβητικούς”***

***“Assesment of natural products for hypoglycemic action for the
production of special nutricient products for diabetics”***

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Σκαμνάκη Βασιλική

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΣΚΟΠΟΣ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
Σακχαρώδης Διαβήτης	9
Η ιστορία του Σακχαρώδη Διαβήτη	9
Συχνότητα εμφάνισης του Σακχαρώδους Διαβήτη	10
Τύποι Σακχαρώδη Διαβήτη	11
Ινσουλίνη και γλυκαγόνη	12
Οι μεταφορείς της γλυκόζης	13
Η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης	14
Διαβήτης τύπου I	16
Διαβήτης τύπου II	17
Γλυκογόνο	18
Μεταβολισμός του γλυκογόνου	18
Σύνθεση του γλυκογόνου	20
Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	22
Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου	24
Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου	26
Ο ρόλος της ινσουλίνης στη σύνθεση του γλυκογόνου	27
Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	28
Δομικά χαρακτηριστικά της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	28

Κέντρα σύδεσης του ενζύμου.....	31
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως αλλοστερικό ένζυμο	32
Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Phk)	35
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων	37
Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά σκευάσματα	37
Camellia sinensis	38
Psichotria frastipeda	38
Quercus suber	38
Phyllanthus embilica.....	39
Το μοντέλο Michaelis-Menten και οι κινητικές ιδιότητες των ενζύμων	39
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
Α. Παρασκευαστικές Μέθοδοι	42
Απομόνωση της καταλυτικής γ-υπομονάδας της μυϊκής κινάσης κονίκλων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (γ-PhK) με υπερέκφραση σε βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i> B834	42
Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> του στελέχους B834 με τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-phk-γ-trunc	42
Έκφραση της καταλυτικής γ-υπομονάδας της μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης τους γλυκογόνου (γ-PhK) σε βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i> B834	43
Λύση των βακτηριακών κυττάρων	45
Καθαρισμός της καταλυτικής γ-υπομονάδας της μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης τους γλυκογόνου (γ-PhK) με χρωματογραφικές μεθόδους.....	45
Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	51
Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων	54
Β. Αναλυτικές Μέθοδοι	58

Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών	58
Μέθοδος Bradford (Biorad protein assay).....	58
Φωτομετρικός προσδιορισμός	58
Κινητική μελέτη της μυϊκής φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου	59
Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	59
Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος α-D-Glc-1-P.....	60
Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (Km).....	60
Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων- Μέθοδος ασκορβικού οξέος	62
Μετατροπή της μυϊκής φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου σε α	63
Προσδιορισμός IC50 αναστολέων στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου α	64
Παρασκευή τυφλών διαλυμάτων.....	65
Επεξεργασία φυτικών εκχυλισμάτων	66
Επεξεργασία κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου β από σκελετικούς μύες κονίκλων	69
Απομόνωση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ-PhK).....	70
Κινητική μελέτη της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Gra).....	74
Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων στη δράση του ενζύμου GPα	75
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	82
ABSTRACT	82
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος, Δημήτρη Δ. Λεωνίδα.

Ολοκληρώνοντας το δύσκολο κομμάτι της συγγραφής αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε μια σειρά από ανθρώπους, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας μου. Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του δίνοντάς μου τη δυνατότητα να εξοικειωθώ με τις απαιτητικές συνθήκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου. Η συνεχής καθοδήγηση, η υπομονή, οι συμβουλές και η βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια συνέβαλαν καταλυτικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Επίκουρο Καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά και τη Λέκτορα Βασιλική Σκαμνάκη για το ενδιαφέρον τους και τη βοήθειά τους.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών Καλλιόπη Παπαδοπούλου, στον μεταδιδακτορικό φοιτητή Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη και στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την προσφορά των φυτικών εκχυλισμάτων.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη στήριξη, τη βοήθειά τους αλλά και το ευχάριστο περιβάλλον. Ξεχωριστή θέση κατέχουν ο υποψήφιος διδάκτορας Στραβοδήμος Γεώργιος και ο μεταπτυχιακός φοιτητής Κυριάκης Ευθύμιος για τη στήριξή τους σε επιστημονικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μπέτα Ραφαηλία και Σολοβού Θεοδώρα καθώς και την προπτυχιακή φοιτήτρια Γκούσκου Τασούλα για τη συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστώ στην οικογένεια μου για τη συνεχή και αταλάντευτη συμπαράσταση και εμπύχωση που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής Επιστημών Υγείας. Η έρευνα αυτή έχει ως στόχο τη μελέτη ενζύμων μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, για την κατανόηση της μοριακής βάσης αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου κατέχει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και τα τελευταία χρόνια αποτελεί στόχο για την ανακάλυψη νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων τόσο φυσικών όσο και συνθετικών, στο πλαίσιο της καταπολέμησης του διαβήτη τύπου 2 (*Hayes and Leonidas, 2010*). Μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα τέτοιων αναστολέων (*Kurukulasuriya et al., 2003*) στη μείωση της γλυκογονόλυσης και τον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη ως προς την αμινοξική ακολουθία με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δύο ενζύμων είναι 100 % στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b, η οποία φωσφορυλιώθηκε με τη βοήθεια κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε a, με στόχο τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* του ενζύμου. Στη συνέχεια έγιναν κινητικές μελέτες ως προς τις ενώσεις με σκοπό τον προσδιορισμό της IC_{50} των εκχυλισμάτων ώστε να καταδειχθεί αν κάποιο από τα εκχυλίσματα έχει την δυνατότητα να επιφέρει αναστολή αυτού.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μια μεταβολική ασθένεια πολλαπλής αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία, λόγω διαταραχών του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών και η οποία είναι αποτέλεσμα ανεπάρκειας στην έκκριση ή τη δράση της ινσουλίνης ή και των δύο.

Η ιστορία του Σακχαρώδη Διαβήτη

Η πρώτη γραπτή αναφορά της νόσου απαντάται στον αιγυπτιακό ιατρικό πάπυρο Ebers, ένα κείμενο που χρονολογείται στο 1550 π.Χ. Την ονομασία «Διαβήτης» εισήγαγε ο ιατρός Αρεταίος ο Καππαδόκης (120-200 π.Χ.), η τρίτη μεγαλύτερη ιατρική προσωπικότητα της αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη και τον Γαληνό, εμπνεόμενος από το ρήμα “διαβαίνω”, χαρακτηρίζοντας έτσι την νοσηρή κατάσταση κατά την οποία το νερό, που ακατάπαυστα λαμβάνει ο άρρωστος για να ικανοποιήσει το έντονο αίσθημα δίψας που έχει, “διαβαίνει”, σαν μέσα από ένα σιφώνιο αναλλοίωτο και καταλήγει στα ούρα. Ο ορισμός “διαβήτης” βασίστηκε στα κύρια συμπτώματα της νόσου (πολυουρία – πολυδιψία) και επικρατεί ως τις μέρες μας διεθνώς και σε όλες τις γλώσσες.

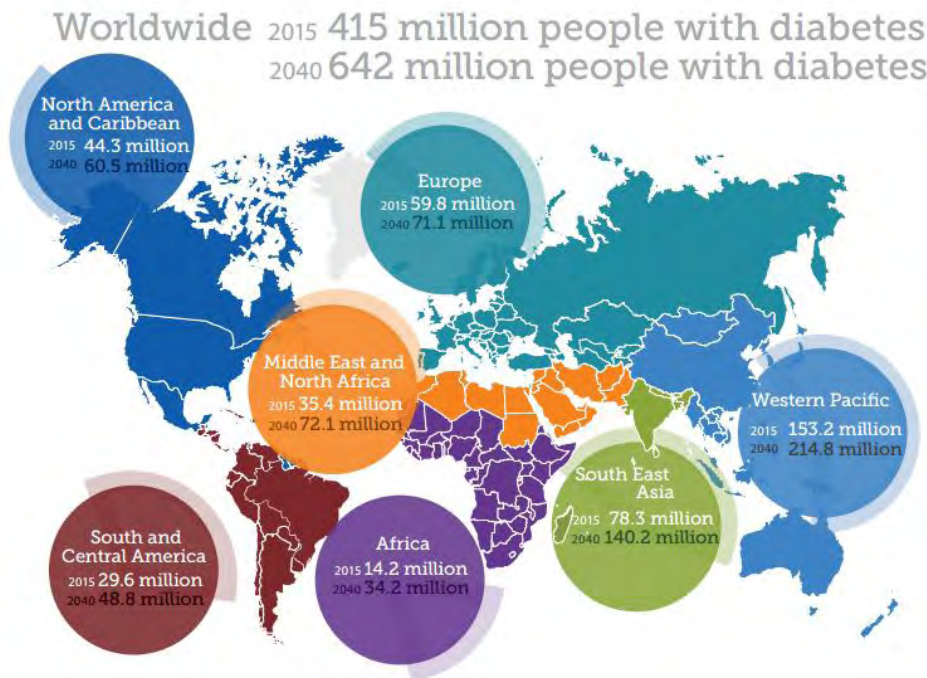
Ο προσδιορισμός «Σακχαρώδης» προστέθηκε στη λέξη Διαβήτης μόλις τον 17ο αιώνα μ.Χ, όταν διαπιστώθηκε ότι τα ούρα των ασθενών είχαν γλυκιά γεύση, όπως ανακαλύφθηκε στον αμέσως επόμενο αιώνα, το οποίο οφείλονταν στη παρουσία γλυκόζης σε αυτά. Τέλος, το 1889 μ.Χ. συσχετίζεται για πρώτη φορά η ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη με τη δυσλειτουργία του παγκρέατος, με τα ιστορικά πειράματα δύο ερευνητών από το Στρασβούργο, των Minkowski και Mering. Οι ιατροί αυτοί αφαίρεσαν το πάγκρεας από σκύλους και διαπίστωσαν την άμεση εμφάνιση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων του διαβήτη, της πολυουρίας και της πολυδιψίας στα πειραματόζωά τους, με την ταυτόχρονη παρουσία τεράστιων ποσοτήτων γλυκόζης στα

ούρα τους. Με αυτό το πείραμα, το όργανο που ευθυνόταν για το διαβήτη είχε πλέον προσδιοριστεί.

Συχνότητα εμφάνισης του Σακχαρώδους Διαβήτη

Ο διαβήτης αλλάζει δραστικά τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός χρησιμοποιεί το φαγητό. Στο επίκεντρο του προβλήματος βρίσκεται η ινσουλίνη, μια ορμόνη της οποίας ο ρόλος είναι να βοηθάει τη γλυκόζη να μπαίνει μέσα στα κύτταρα του οργανισμού και να χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας.

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης ή απλά Διαβήτης είναι η πιο κοινή χρόνια μεταβολική ασθένεια στη σύγχρονη κοινωνία. Περισσότερο από το 90 % του πληθυσμού που πάσχει από διαβήτη έχει διαγνωσθεί με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (Τύπου II) (Deyetal.,2003). Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση για το Διαβήτη (IDF) το 2015 περισσότερα από 415 εκατομμύρια άτομα είχαν διαβήτη σε παγκόσμιο επίπεδο. Αν ο ρυθμός αύξησης των περιστατικών της νόσου εξακολουθήσει, το 2040 αναμένονται περισσότεροι από 642 εκατομμύρια άνθρωποι να πάσχουν από διαβήτη σε όλον τον κόσμο.



Εικόνα 1: Κατανομή των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως (IDF)

Τύποι Σακχαρώδη Διαβήτη

Η ταξινόμηση των διαφόρων τύπων διαβήτη γίνεται με βάση την ποσότητα της εκκρινόμενης ινσουλίνης, καθώς και με το αν η αντιμετώπιση του διαβήτη περιλαμβάνει τη χορήγηση ινσουλίνης ή όχι.

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες:

α) Ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης ή διαβήτης τύπου I

Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να υπάρχει ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Υπό αυτή την έννοια, ο ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I είναι απόλυτα εξαρτημένος από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα του να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες.

β) Μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης ή διαβήτης τύπου II

Η μορφή αυτή αποτελεί τη συνηθέστερη των τριών (περίπου το 80% του συνόλου των διαβητικών). Στα άτομα αυτά, το πάγκρεας παράγει λιγότερη ινσουλίνη απ' αυτή που χρειάζεται ο οργανισμός τους με αποτέλεσμα την αυξημένη τιμή του σακχάρου στο αίμα. Ο τύπος αυτός σχετίζεται στενά με την παχυσαρκία και προσβάλλει ανθρώπους ασχέτως ηλικίας.

γ) Διαβήτης κύησης

Πρόκειται για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου II ως προς την ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και την ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Σήμερα είναι γνωστό ότι ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται στο 3-5 % των κυήσεων και σχετίζεται με την παχυσαρκία. Ο διαβήτης κύησης είναι αναστρέψιμη νόσος, η οποία υποχωρεί μετά τον τοκετό, συνδέεται όμως με περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία μητέρας και νεογνού.

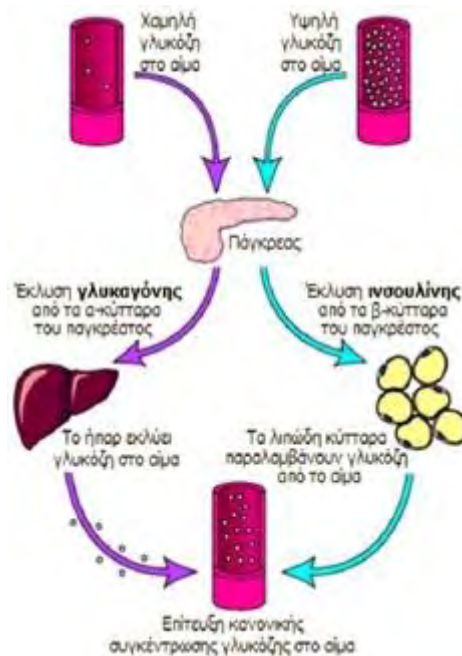
ε) Άλλοι ειδικοί τύποι

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι τύποι που οφείλονται σε διάφορες ειδικές γενετικές διαταραχές (όπως διάφοροι τύποι "MODY", Maturity Onset Diabetes of the Young), σε συγκεκριμένες παθήσεις του παγκρέατος (παγκρετίτιδα, τραύμα, καρκίνο κ.ά.), σε παθήσεις διαφόρων ενδοκρινών αδένων (επινεφρίδια, θυρεοειδής κ.ά.), σε λήψη φαρμάκων (κορτιζόνη, διουρητικά κ.ά.) και σε ειδικά γενετικά σύνδρομα (πχ σύνδρομο Down).

Ινσουλίνη και γλυκαγόνη

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη είναι πολυπεπτιδικές ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος από το πάγκρεας (ενδοκρινείς ορμόνες). Με τις δύο αυτές ορμόνες ρυθμίζεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσο όρο πρέπει να παραμένει σε μια στενή περιοχή (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Οι δύο αυτές ορμόνες έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων και η δράση της είναι καταβολική.

Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της διεγείρεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυική δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο γλυκογόνο στο ήπαρ και στους μυς προς γλυκόζη.



Εικόνα 2: Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη η οποία κατευθύνεται στο ήπαρ. Όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλή τότε απελευθερώνεται γλυκαγόνη που λαμβάνεται από το ήπαρ και του μυς. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης.

Η συσσώρευση της γλυκόζης στο αίμα από τη λήψη των τροφών, δεν παραμένει στο σύνολό της στην κυκλοφορία του αίματος. Αποθηκεύεται υπό μορφή συνενωμένων μορίων γλυκόζης, σε ένα μεγάλο μόριο που ονομάζεται γλυκογόνο. Το μεγαλομόριο του γλυκογόνου αποδεσμεύει τα πρωταρχικά μόρια γλυκόζης από τα οποία αποτελείται, απελευθερώνοντάς τα στο αίμα και διαθέτοντάς τα ως καύσιμο υλικό, έως την επόμενη λήψη τροφής. Το γλυκογόνο έχει χρόνο ζωής από τη στιγμή σύνθεσής του έως την αποδόμησή του σε μόρια γλυκόζης, δηλαδή από την λήψη της τροφής κατά τη διάρκεια της νηστείας έως το επόμενο γεύμα, για χρόνο περίπου 8-12 ώρες.

Παράλληλα, προωθεί τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, της μετατροπής δηλαδή στο ήπαρ των αμινοξέων σε γλυκόζη, γεγονός που αυξάνει περαιτέρω τη στάθμη της γλυκόζης του αίματος. Τέλος, στο λιπώδη ιστό ενεργοποιεί τη λιπόλυση, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.

Οι μεταφορείς της γλυκόζης

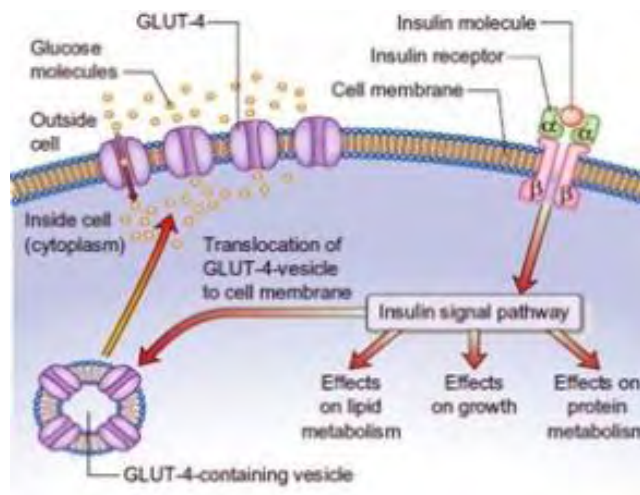
Όλα τα κύτταρα του σώματος έχουν την ανάγκη να προσλάβουν γλυκόζη για την παραγωγή της αναγκαίας ενέργειας για την διασφάλιση της ζωής τους, όπως και το σύνολο του οργανισμού. Πρόσληψη σημαίνει διαπίδυση των μορίων της γλυκόζης στον ενδοκυττάριο χώρο. Εκεί, με δύο σειρές αντιδράσεων, η πρώτη σειρά πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και αφορά αντιδράσεις αναερόβιες και η δεύτερη σειρά πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια με την κατανάλωση οξυγόνου, παράγεται διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ενέργεια. Για την πρόσληψη της γλυκόζης στο κύτταρο με σκοπό την καύση της απαιτείται η συνεργική δράση των υποδοχέων της ινσουλίνης και των μεταφορέων της γλυκόζης GLUTs.

Ο μεταφορέας γλυκόζης είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από 12 ενδομεμβρανικές έλικες συνδεδεμένες μεταξύ τους με εξωμεμβρανικούς κρίκους. Πέντε τύποι αυτού του μεταφορέα έχουν περιγραφεί (GLUT 1 έως 5), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια διαθέτουν μόνο τον τύπο GLUT1, ο τύπος 2 στα κύτταρα συναντάται στα κύτταρα του ήπατος και τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ο τύπος 3 βρίσκεται κυρίως στα κύτταρα του εγκεφάλου, ο 4 στα κύτταρα των μυών και των λιποκυττάρων, ενώ ο 5 βρίσκεται στα κύτταρα του λεπτού εντέρου.

Ο τύπος GLUT4 των μεταφορέων της γλυκόζης είναι πολύ σημαντικός για την κατανόηση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Εκφράζεται σε ιστούς, όπως ο μυϊκός και το λιπώδες, οι οποίοι προσλαμβάνουν την μεταγευματική γλυκόζη με την δράση της ινσουλίνης. Η πρόσληψη της γλυκόζης πραγματοποιείται με τη δράση της ινσουλίνης,

οποία κινητοποιεί προσχηματισμένα κυτταροπλασματικά μόρια GLUT4, τα οποία μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου.

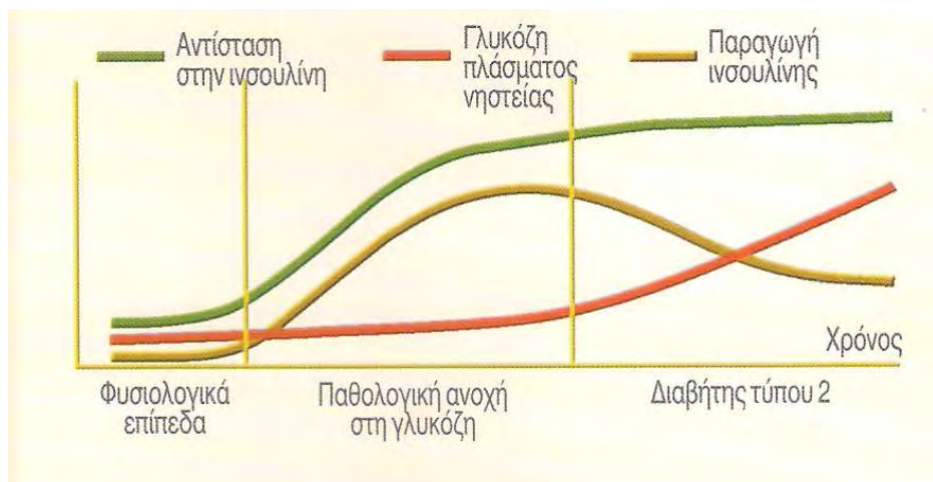
Είναι δυνατόν να διαπιστωθούν γενετικές διαταραχές στον υποδοχέα της ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένων και των διαταραχών του υποδοχέα GLUT, ή και μεταδεσμετικές διαταραχές γενετικού τύπου, στο υπόλοιπο μονοπάτι των αντιδράσεων, οι οποίες έχουν ως συνέπεια την ελλειμματική είσοδο της γλυκόζης στο κύτταρο. Διαταραχές τέτοιων τύπων καταλήγουν στο φαινόμενο της αντίστασης της ινσουλίνης το οποίο είναι το βασικό αίτιο του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης των υποδοχέων της γλυκόζης (αριστερά) και το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί η ινσουλίνη (δεξιά)

Η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης

Το φαινόμενο της μη αποτελεσματικής δράσης της ινσουλίνης, το οποίο συνήθως αποκαλείται αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, παρατηρείται με την αυξημένη ποσότητα της ινσουλίνης στο αίμα με ταυτόχρονη αυξημένη ή και φυσιολογική τιμή σακχάρου στο αίμα.



Εικόνα 4: Διαφορές στα επίπεδα ινσουλίνης, γλυκόζης και αντίστασης στην ινσουλίνη σε διάφορες καταστάσεις του οργανισμού μέχρι την ανάπτυξη Διαβήτη τύπου 2

Η αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης, η οποία παρατηρείται στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, οφείλεται σε βλάβες στα διαφορετικά επίπεδα δράσης της ινσουλίνης, σε όλη τη μάζα των περοφερικών κυττάρων του σώματος. Έτσι, οποιαδήποτε διαταρχή στο μονοπάτι των αλυσιδωτών αντιδράσεων, οι οποίες σχετίζονται με τους υποδοχείς της ινσουλίνης, τους μεταφορείς της γλυκόζης GLUTs και οποιοδήποτε ενδιάμεσο σταθμό, ώστε να αναστέλλεται η πρόσληψη της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων, οπότε να μην πραγματοποιείται η καύση της γλυκόζης, δύναται να καταλογισθεί ως βλάβη, η οποία εκφράζει την αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης. Αποτέλεσμα της αντίστασης στην δράση της ινσουλίνης είναι η συσσώρευση των μορίων του σακχάρου στο αίμα.

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται με την αυξημένη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων κυρίως στο εσωτερικό των μυϊκών κυττάρων ή στο ήπαρ. Συμβαίνει δηλαδή, μετατόπιση του λίπους από τον λιπώδη ιστό, σε ιστικές θέσεις οι οποίες συνήθως δεν συμβιούν με το λίπος. Η παρουσία των τριγλυκεριδίων, σε αυτούς τους χώρους της περιφέρειας του σώματος, εκδηλώνει την ικανότητα επηρεάζει το μονοπάτι σύνδεσης της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της στις κυτταρικές μεμβράνες και τους μεταφορείς γλυκόζης GLUTs, εκφράζοντας έτσι την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Είναι γνωστό ότι ο τύπος της κεντρικής παχυσαρκίας (εναπόθεση λίπους στην κοιλιακή χώρα) συσχετίζεται ισχυρά με το φαινόμενο της αντίστασης στην δράση της ινσουλίνης, το βασικό αίτιο του σακχαρώδη διαβήτη. Το γεγονός ότι περισσότεροι από το 80 % των διαβητικών ασθενών είναι παχύσαρκοι οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αιτία της αντίστασης στην ινσουλίνη προέρχεται από την αύξηση του σωματικού λίπους.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη έχει ενοχοποιηθεί και ως αιτιολογικός παράγοντας της αρτηριακής υπέρτασης. Αποτέλεσμα της αντίστασης είναι η αύξηση της εκκρινόμενης τιμής της ινσουλίνης (υπερινσουλιναιμία) από το πάγκρεας, η οποία διαθέτει τις παρακάτω δυνατότητες:

- αυξημένη κατακράτηση νατρίου και νερού από το άπω εσπειραμτικό σωληνάριο του νεφρώνα, με αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου του αίματος με συνέπεια την αρτηριακή υπέρταση
- αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση νατρίου στις λείες μυϊκές ίνες του τοιχώματος των αγγείων, με αποτέλεσμα την αγγειοσυστολή των αγγείων, άρα τη δημιουργία της αρτηριακής υπέρτασης
- αύξηση της δράσης του αυτόνομου (συμπαθητικού) νευρικού συστήματος με συνέπεια την έκκριση κατεχολαμινών (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη) με κατάληξη την αύξηση της αρτηριακής πίεσης

Διαβήτης τύπου Ι

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου Ι, είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αποπτωτικών, φλεγμονωδών, περιβαλλοντικών, γενετικών και ανοσιακών παραγόντων, οι οποίοι οδηγούν (συνολικά) στην αυτοάνοση καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων. Τα άτομα με γενετική προδιάθεση ανάπτυξης διαβήτη, έχουν φυσιολογική μάζα β-κυττάρων κατά τη γέννησή τους, με την απώλεια των κυττάρων να επέρχεται μήνες ή και έτη αργότερα. Ο ρυθμός μείωσης της ποσότητας των β-κυττάρων ποικίλει μεταξύ των ατόμων, ενώ ο διαβήτης εμφανίζεται αφού έχει καταστρέψει το 80 % της μάζας των β-κυττάρων.

Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι εμφανίζεται πλήρης έλλειψη ινσουλίνης. Λόγω της ανεπάρκειας ινσουλίνης παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ, καταστέλλεται η γλυκόλυση. Στο διαβήτη τύπου Ι απουσιάζει η ινσουλίνη και συνεπώς η γλυκαγόνη βρίσκεται σε επίπεδο υψηλότερο του φυσιολογικού.

Ο ασθενής είναι άμεσα εξαρτώμενος από την εξωγενή χορήγηση της γλυκόζης ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα του σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο υψηλός λόγος γλυκαγόνης/ινσουλίνης στον διαβήτη προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου. Έτσι, παράγεται περίσσεια γλυκόζης από το ήπαρ η οποία απελευθερώνεται στο αίμα. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα όταν η συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη από

εκείνη που μπορεί να απορροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια (Saltiel and Kahn, 2001).

Διαβήτης τύπου II

Αντίθετα με το διαβήτη τύπου I, στον οποίο απουσιάζει εντελώς η ινσουλίνη, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης.

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης, ελάττωση ευαισθησίας των κυττάρων σε αυτή (ινσουλινοαντοχή) που έχει ως επακόλουθο τη μη επαρκή δράση της ινσουλίνης (Albetri et al, 2004).

Οι καθοριστικές μεταβολές που επιφέρουν οι πρωταρχικές αιτίες, σχετίζονται με δύο φαινόμενα:

1. τη μεταβολή στην ποσότητα έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας
2. τη μεταβολή της δράσης της ινσουλίνης (αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης)

Ο έλεγχος επιτυγχάνεται κυρίως με την κατάλληλη διαίτα και τη σωματική άσκηση, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις είναι απαραίτητη και η θεραπευτική αγωγή προκειμένου να μειωθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Συγκεκριμένα, στις μέρες μας χορηγούνται κυρίως τα παρακάτω θεραπευτικά ανάλογα:

Ινσουλίνη: καταστέλλει την παραγωγή της γλυκόζης ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την χρησιμοποίηση της από τα κύτταρα.

Σουλφονουλουρίες (και ουσίες υποβοήθησης έκκρισης της ινσουλίνης): αυξάνουν την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κυττάρα του παγκρέατος.

Μετφορμίνη: μειώνει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ.

Αναστολείς της α γλυκοσιδάσης (ακαρβόζη): επεμβαίνουν στον μηχανισμό απορρόφησης της γλυκόζης από το έντερο.

Αγωνιστές του υποδοχέα γ του υπεροξειδιοσώματος (PPAR γ) (θειαζολιδινεδιόνες): επαυξάνουν την δράση της ινσουλίνης.

Ωστόσο, οι παρενέργειες που προκαλεί η θεραπεία με τα φάρμακα αυτά στην πραγματικότητα υπερισχύουν έναντι του όφελους που υπάρχει. Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που έκαναν χρήση των παραπάνω φαρμάκων παρουσίασαν σοβαρά προβλήματα παχυσαρκίας, υπογλυκαιμίας ακόμα και αντίστασης στην ινσουλίνη (Bailey, 2000). Επιπλέον οι σουλφονουλουρίες σταματούν να έχουν ικανοποιητική δράση

όταν χορηγούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους ίδιους ασθενείς. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη η χορήγηση ενός πιο δραστικού φαρμάκου (*Moller, 2001*).

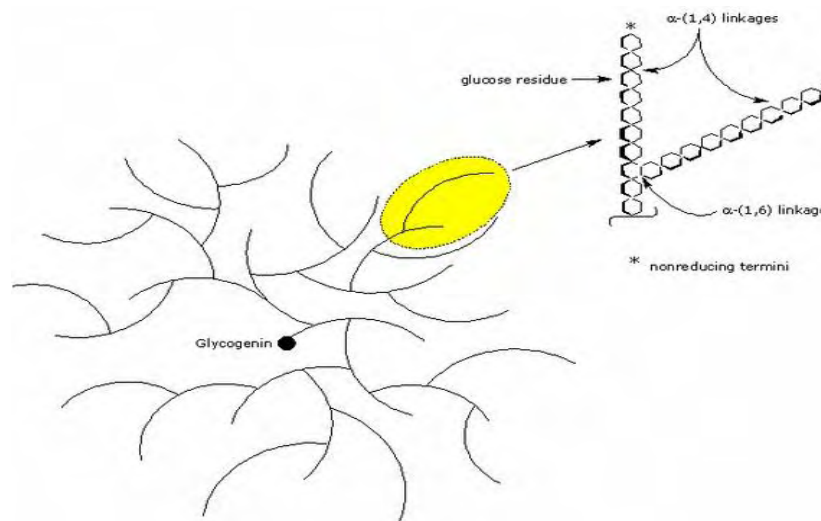
Καθώς οι ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για τον διαβήτη τύπου II δεν είναι ικανοποιητικές κρίνεται απαραίτητη η εύρεση ενός άλλου δραστικού και ασφαλούς τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Τα τελευταία χρόνια η κατανόηση των βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με αυτή τη μεταβολική διαταραχή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν πολλές πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Μια από αυτές είναι η μείωση της υπερβολικής παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ η οποία μπορεί να επιτευχθεί με ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης γλυκογόνου ελαττώνοντας την ταχύτητα με την οποία αποικοδομεί το γλυκογόνο.

Γλυκογόνο

Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο ανήκει στην κατηγορία των πολυσακχαριτών, είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει ενέργεια όταν αυτό είναι απαραίτητο.

Οι μονάδες α-D γλυκόζης, από τις οποίες αποτελείται το μόριο του γλυκογόνου, συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό και σχηματίζουν μεγάλου μήκους αλυσίδες που διακλαδίζονται με τον σχηματισμό α-1,6 γλυκοζιτικών δεσμών. Ο μεγάλος αριθμός των διακλαδώσεων έχει ιδιαίτερη σημασία από φυσιολογική άποψη. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται πολλά ελεύθερα άκρα, στα οποία προσκολλώνται τα πλεονάζοντα μόρια της γλυκόζης που αποθηκεύεται προσωρινά και από τα οποία μπορεί να αρχίσει συγχρόνως η απομάκρυνση μορίων γλυκόζης, όταν οι ανάγκες του οργανισμού το απαιτούν. Η δημιουργία του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω μιας πρωτεΐνης, της γλυκογενίνης, η οποία αναλαμβάνει τη “σύνδεση” των πρώτων μορίων γλυκόζης και στη συνέχεια αναλαμβάνουν άλλα ένζυμα τη μεγέθυνση του μορίου. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στο κέντρο των σφαιριδίων γλυκογόνου.



Εικόνα 5: Σφαιρική δομή του γλυκογόνου. Στο κέντρο του σφαιριδίου υπάρχει ως πυρήνας η πρωτεΐνη γλυκογενίνη. Η δημιουργία του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω μιας πρωτεΐνης της γλυκογενίνης, η οποία αναλαμβάνει τη "σύνδεση" των πρώτων μορίων γλυκόζης και στη συνέχεια αναλαμβάνουν άλλα ένζυμα τη μεγάλυνση του μορίου. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στο κέντρο των σφαιριδίων του γλυκογόνου.

Είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι μεγαλύτερη στο ήπαρ παρά στους μύς (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Αυτό βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή κόκκων διαμέτρου 100 έως 400 Å που περιέχουν τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Ο σημαντικός ρόλος της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ, φαίνεται από τα παρακάτω:

1. ρυθμίζουν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα και δημιουργείται μια «δεξαμενή» γλυκόζης για συνεχή μυϊκή δραστηριότητα
2. τόσο η σύνθεση όσο και η αποικοδόμηση γίνονται από διαφορετικές μεταβολικές οδούς πράγμα που αποδεικνύει μια σπουδαία βιοχημική αρχή

3. η ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου γίνεται με μηχανισμούς γενικότερης σημασίας

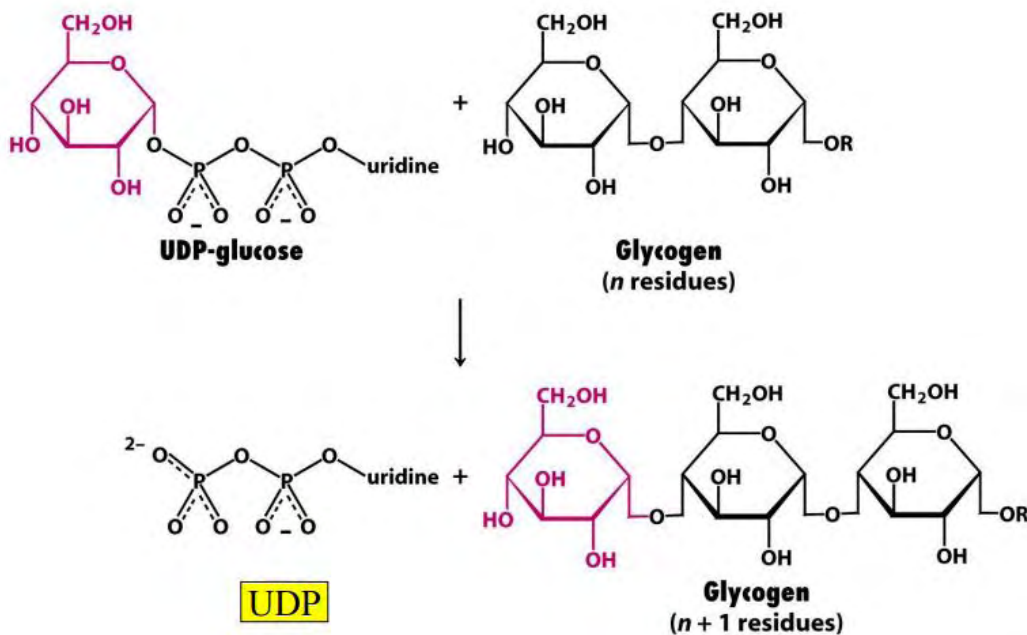
Κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου αποδίδονται μόρια γλυκόζης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) ελέγχεται από δύο ορμόνες, τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη. Και οι δύο ορμόνες επηρεάζουν τη δραστηριότητα δύο ενζύμων, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, το οποίο συμμετέχει στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ενεργοποιείται, και της συνθετάσης του γλυκογόνου, που συμμετέχει στη σύνθεση του γλυκογόνου και απενεργοποιείται. Αντίθετα, η σύνθεση του γλυκογόνου (γλυκονεογένεση) διεγείρεται από την ινσουλίνη.

Σύνθεση του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο συντίθεται από μια διαφορετική οδό από αυτή της αποικοδόμησής του, ακολουθώντας μια βασική αρχή της βιοχημείας: *οι βιοσυνθετικές και οι αποικοδομητικές οδοί στα βιολογικά συστήματα ακολουθούν ξεχωριστές πορείες και αυτό προσδίδει μεγαλύτερη ευελιξία τόσο στην ενεργειακή θεώρηση μιας αντίδρασης όσο και στον έλεγχό της*. Το γλυκογόνο μπορεί να συντεθεί ανεξάρτητα από το πόσο μεγάλη είναι η τιμή του λόγου $[Glc-1-P]/[Pi]$.

Το 1957, ο Luis Leloir και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το γλυκογόνο συντίθεται με μια πορεία που χρησιμοποιεί ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη, ο δότης γλυκόζης στη βιοσύνθεση του γλυκογόνου, είναι μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης. Ο άνθρακας C-1 της γλυκοζυλικής στην UDP-γλυκόζη είναι ενεργοποιημένος διότι το υδροξύλιό του είναι ενεργοποιημένο με τη μονάδα διφωσφορικού της UDP. Η UDP-γλυκόζη συντίθεται από 1-φωσφορική γλυκόζη και τρψωσφορική ουριδίνη (UTP) σε μια αντίδραση που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης.

Η συνθάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση:



(όπου n ο αριθμός των μορίων γλυκόζης στο μόριο του γλυκογόνου)

Από την αντίδραση είναι φανερό ότι προκειμένου να δράσει το ένζυμο χρειάζεται γλυκογόνο. Στην πράξη, ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι τέτοιος ώστε το ένζυμο να μεταφέρει γλυκόζη από την UDP-γλυκόζη σε μια αλυσίδα α -1,4 πολυμερούς γλυκόζης με ελάχιστο 4 μονάδες γλυκόζης, δημιουργώντας έναν α -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό.

Η συνθάση του γλυκογόνου προσθέτει κατάλοιπα γλυκόζης όταν η πολυσακχαριτική αλυσίδα περιέχει ήδη περισσότερα από 4 κατάλοιπα. Διαφορετικά, απαιτείται η παρουσία ενός εκκινήτη. Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία διεκπεραιώνεται από τη γλυκογονίνη, μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες 73 kD, κάθε μια από τις οποίες περιέχει έναν ολιγοσακχαρίτη αποτελούμενο από γλυκόζες με δεσμούς α -1,4. Κάθε υπομονάδα της γλυκογονίνης καταλύει την προσθήκη οκτώ μονάδων γλυκόζης ενώ η UDP-γλυκόζη είναι δότης στην πορεία αυτογλυκοζυλίωσης. Στο σημείο αυτό η συνθάση του γλυκογόνου αναλαμβάνει να επεκτείνει το μόριο του γλυκογόνου (*Gibbons et al., 2002*).

Το γλυκογόνο όμως, ως διακλαδισμένο πολυμερές εκτός από α -1,4 δεσμούς, που καταλύονται από την συνθάση του γλυκογόνου, έχει και α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς που απαντώνται στις διακλαδώσεις και συντίθενται από την άμυλο 1,4 \rightarrow 1,6

τρανσγλυκοζυλάση, καθώς οι αρμοδιότητες της συνθάσης περιορίζονται μόνο στους α-1,4 δεσμούς. Αυτό το ένζυμο διακλάδωσης είναι μεγάλης ακρίβειας και μεταφέρει μια ομάδα δομικών μονάδων γλυκόζης, με την προϋπόθεση να περιλαμβάνει το μη αναγωγικό άκρο, να προέρχεται από μια αλυσίδα μήκους τουλάχιστον έντεκα μονάδων και να δημιουργεί διακλάδωση που απέχει τουλάχιστον τέσσερις μονάδες από την προηγούμενη.

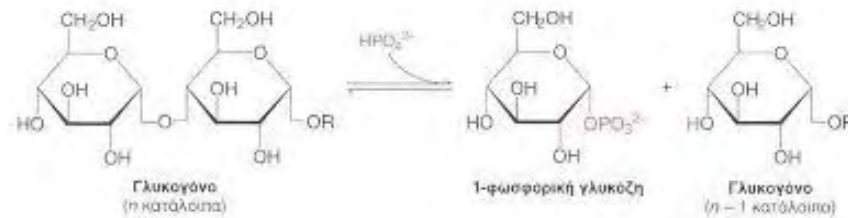
Ο σχηματισμός διακλαδώσεων είναι σημαντικός διότι αυξάνει τη διαλυτότητα του γλυκογόνου. Επιπλέον, δημιουργεί έναν μεγάλο αριθμό τελικών καταλοίπων, τα οποία είναι θέσεις δράσης της φωσφορυλάσης και της συνθάσης του γλυκογόνου. Έτσι, ο σχηματισμός διακλαδώσεων αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου.

Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της αποικοδόμησης του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) μελετήθηκε αρχικά από του *Carl* και *Gert Cori* (*Cori and Cori 1936, βραβείο Nobel 1947*) οι οποίοι απομόνωσαν το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά προς σχηματισμό ενός νέου φωσφορυλιωμένου σακχάρου, την 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P).



Η φωσφορυλάση, το ένζυμο-κλειδί στον καταβολισμό του γλυκογόνου, καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού ατόμου οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α στον C-1 διατηρείται (*Stryer, 1997*).



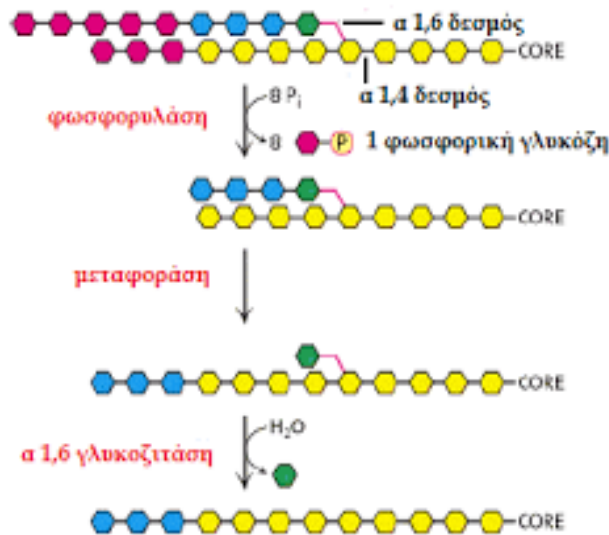
Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος ισορροπίας του ορθοφωσφορικού προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6. Η τιμή της ΔG° για την αντίδραση αυτή είναι μικρή διότι ένας γλυκοζιτικός δεσμός αντικαθίσταται από έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό, ο οποίος έχει περίπου το ίδιο δυναμικό μεταφοράς.

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα απέδιδε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη, φορτισμένη αρνητικά υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεν είναι δυνατό να διαχυθεί εκτός του κυττάρου.

Η 1-φωσφορική γλυκόζη που σχηματίζεται κατά τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου μπορεί να μετατραπεί σε 6-φωσφορική γλυκόζη για να εισέλθει στην κύρια μεταβολική πορεία. Αυτή η μετατόπιση της φωσφορικής ομάδας καταλύεται από τη φωσφογλυκομουτάση. Για να επιτευχθεί η μετατροπή αυτή, το ένζυμο συμμετέχει στην ανταλλαγή μιας φωσφορικής ομάδας με το υπόστρωμα. Το καταλυτικό κέντρο ενός μορίου δραστικής μούτάσης περιέχει ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σερίνης. Η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από το κατάλοιπο σερίνης προς την υδροξυλική ομάδα του C-6 της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς σχηματισμό 1,6-διφωσφορικής γλυκόζης. Η φωσφορική ομάδα από τον C-1 αυτού του ενδιαμέσου μεταπηδά στη συνέχεια στο ίδιο κατάλοιπο σερίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή 6-φωσφορικής γλυκόζης και την αναγέννηση του φωσφοενζύμου.

Το γλυκογόνο αποικοδομείται σε περιορισμένη έκταση από τη φωσφορυλάση. Οι α-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί, στα σημεία των διακλαδώσεων δεν διασπώνται από αυτό το ένζυμο. Όταν αυτό φθάσει σε απόσταση 4 μονάδων γλυκόζης από μια διακλάδωση η δράση του σταματά. Η αποικοδόμηση προχωράει με την παρέμβαση δύο άλλων ενζύμων. Μια μεταφοράση και μια γλυκοζιδάση δεσμού α-1,6 ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο για να συνεχιστεί η αποικοδόμηση από την φωσφορυλάση. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε

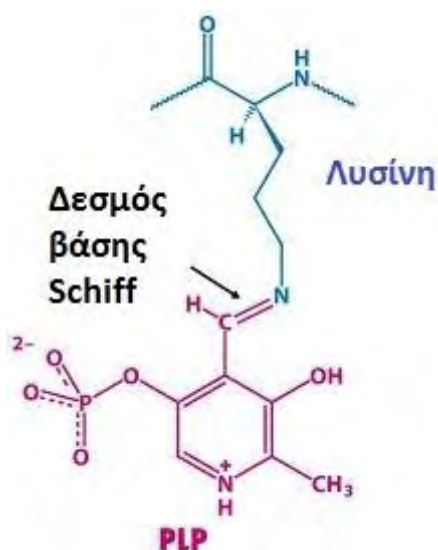
μια άλλη. Αυτή η μεταφορά αφήνει εκτεθειμένο ένα κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6. Η γλυκοζιδάση δεσμού α -1,6 γνωστή ως το ένζυμο αποδιακλάδωσης υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Αυτό το ελεύθερο μόριο γλυκόζης φωσφορυλιώνεται από το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση. Έτσι, η μεταφορά και το ένζυμο αποδιακλάδωσης (γλυκοζιδάση δεσμού α -1,6) μετατρέπουν τη διακλαδισμένη δομή σε γραμμική συμβάλλοντας στην περαιτέρω διάσπαση από τη φωσφορυλάση.



Εικόνα 6: Ανακατασκευή γλυκογόνου

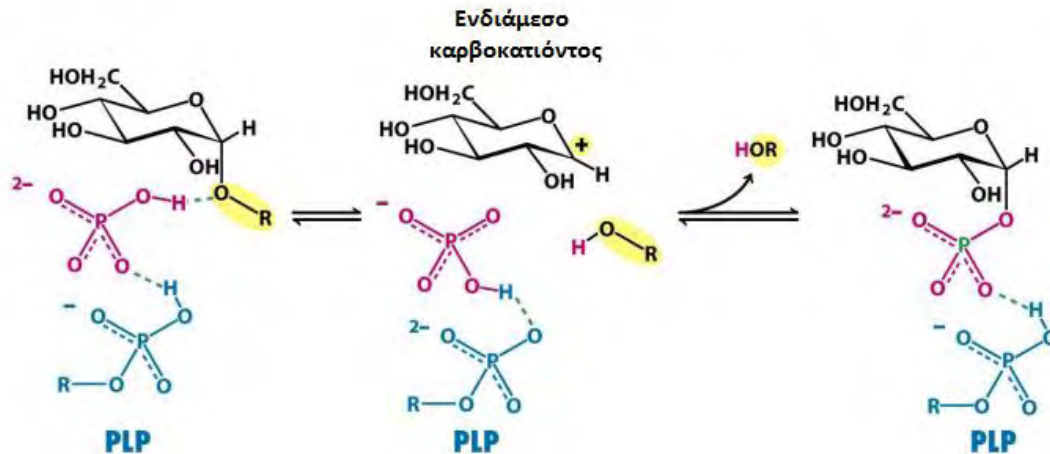
Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Για την εξοικονόμηση της ATP, που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης, η φωσφορυλάση διασπά το γλυκογόνο φωσφορλυτικά και όχι υδρολυτικά. Η διάσπαση αυτή απαιτεί τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα βασικό στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιο πιθανό ενδεχόμενο είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν.



Εικόνα 7: Δεσμός βάσης Schiff της φωσφορικής πυριδοξάλης. Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) σχηματίζει βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης.

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι ότι χρειάζεται η 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μιας συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ανιόν (με τη μορφή HPO_4^{2-}) δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι συνδεδεμένο στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης.



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία ελέγχεται με διάφορους αλληλοσυνδεόμενους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη ρύθμιση όλων των παραπάνω ενζύμων που αναφέρθηκαν είτε με αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου είτε με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση ως απόκριση σε ορμονικά σήματα (Agius, 2010).

Η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη είναι δύο ορμόνες, που διεγείρουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου μέσω ειδικών υποδοχέων 7TM. Η μυϊκή δραστηριότητα ή η αναμονή της οδηγούν σε απελευθέρωση από τον μυελό των επινεφριδίων επινεφρίνης (αδρεναλίνης), μιας κατεχολαμίνης που προκύπτει από την τυροσίνη. Η επινεφρίνη διεγείρει σε μεγάλο βαθμό την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους μυς και σε μικρότερη έκταση στο ήπαρ, το οποίο είναι περισσότερο ευαίσθητο στη γλυκαγόνη. Φυσιολογικά, η γλυκαγόνη υποδηλώνει την κατάσταση ασιτίας.

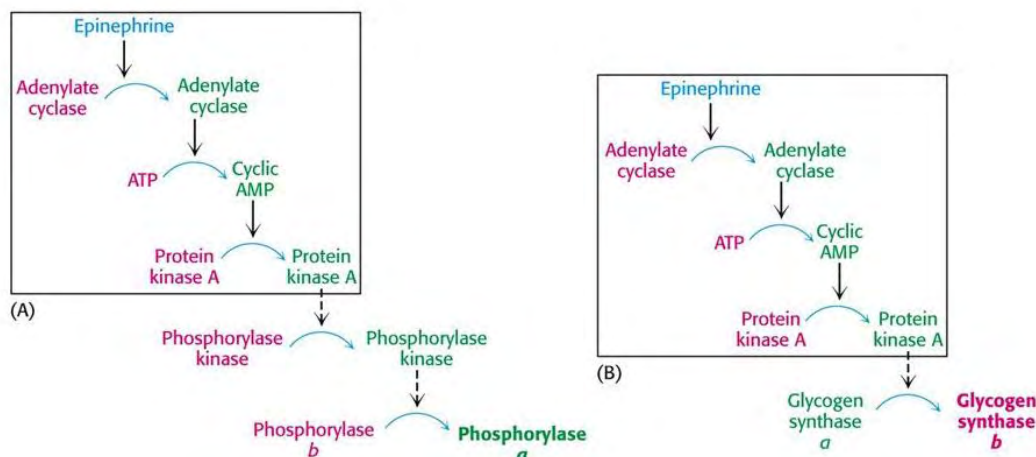
- Η επινεφρίνη προσδένεται στον αδρενεργικό υποδοχέα β στους μυς, ενώ η γλυκαγόνη προσδένεται στον υποδοχέα της γλυκαγόνης. Η πρόσδεση ενεργοποιεί την υπομονάδα α της πρωτεΐνης Gs που δεσμεύει GTP.
- Ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία καταλύει τον σχηματισμό της κυκλικής AMP από ATP.

- Η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση της cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A μέσω δέσμευσης της κυκλικής AMP στη ρυθμιστική υπομονάδα, η οποία στη συνέχεια αποδεσμεύεται από την καταλυτική υπομονάδα και έτσι ενεργοποιείται η καταλυτική υπομονάδα.
- Η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) φωσφορυλιώνει την υπομονάδα β της κινάσης της φωσφορυλάσης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το ενεργό αυτό ένζυμο προκαλεί την μετατροπή της ανενεργής GPb στην ενεργή μορφή GPα. Επιπλέον, η πρωτεϊνική κινάση A προσθέτει μια φωσφορική ομάδα στη συνθάση του γλυκογόνου, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτός ο μηχανισμός ελέγχου εμποδίζει τη σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμησή του. Ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος ρυθμίζεται συνολικά από μια πορεία αντιδράσεων (Stryer, 1997).
- Η κινάση της φωσφορυλάσης μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί εν μέρει από Ca^{+2} . Η υπομονάδα δ είναι ένας αισθητήρας ασβεστίου που διεγείρει πολλά ένζυμα στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Cohen, 1978).

Ο ρόλος της ινσουλίνης στη σύνθεση του γλυκογόνου

Η γλυκαγόνη είναι μια ορμόνη η οποία δίνει το αρχικό έναυσμα για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε περιόδους ασιτίας. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά, η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση του γλυκογόνου μέσα από μια διεργασία η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1):

1. Δέσμευση της ινσουλίνης σε έναν υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μια πρωτεϊνικής κινάσης ευαίσθητης στην ινσουλίνη
2. Η πρωτεϊνική κινάση φωσφορυλιώνει την PP1 και δημιουργεί κατάλληλες προϋποθέσεις για τη δημιουργία ενός συμπλόκου της πρωτεΐνης με το γλυκογόνο.
3. Η αποφωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, της κινάσης της φωσφορυλάσης και της φωσφορυλάσης έχει ως αποτέλεσμα την σύνθεση του γλυκογόνου και εμποδίζει την αποικοδόμηση του (Bollen et al., 1998).

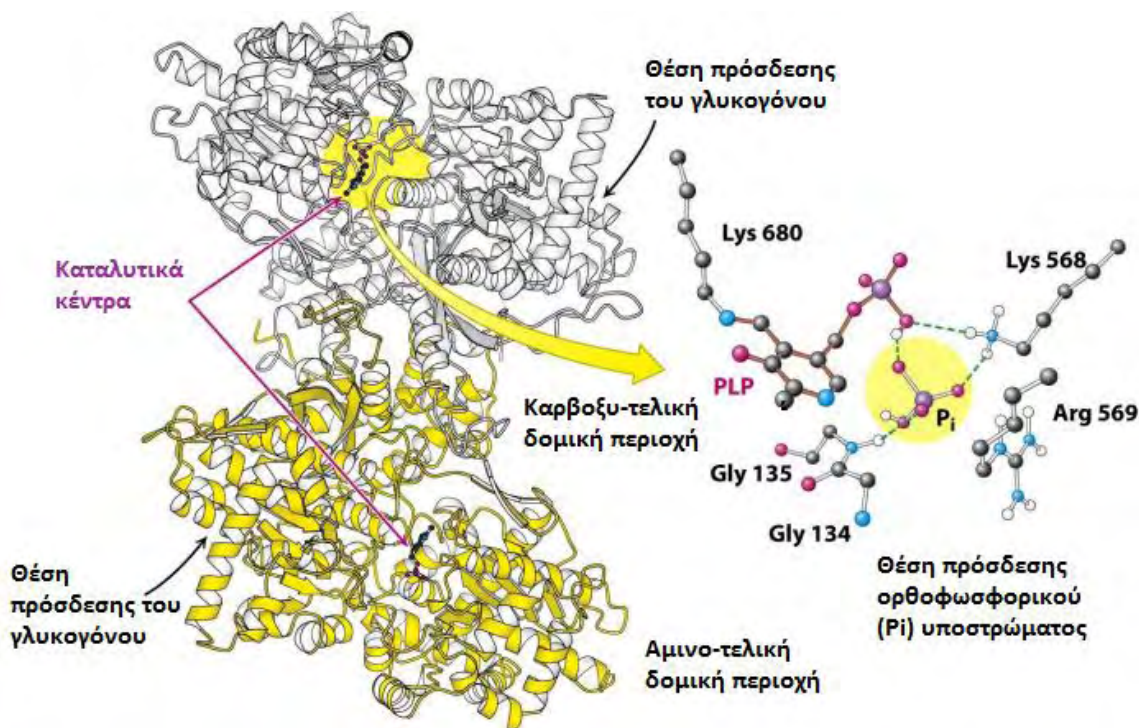


Εικόνα 9: Συντονισμένος έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο μεταβολισμός ρυθμίζεται, εν μέρει, με καταρράκτες κυκλικής AMP με ορμονικό έναυσμα: (Α) αποικοδόμηση του γλυκογόνου, (Β) σύνθεση του γλυκογόνου. Οι ανενεργές μορφές δείχνονται με κόκκινο και οι ενεργές με πράσινο, Η αλληλουχία των αντιδράσεων που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Α είναι η ίδια στη ρύθμιση της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου. Η κινάση της φωσφορυλάσης απενεργοποιεί επίσης τη συνθάση του γλυκογόνου.

Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Δομικά χαρακτηριστικά της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kD (841 αμινοξέα η μυϊκή GP, 846 αμινοξέα η ηπατική GP και 862 αμινοξέα η GP του εγκεφάλου) και από το συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 με ομοιοπολικό δεσμό βάσης Schiff, σε κάθε υπομονάδα (Fischer *et al.*, 1958). Η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητα του ενζύμου (Oikonomakos *et al.*, 1992). Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως το καταλυτικό κέντρο, το αλλοστερικό κέντρο αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.



Εικόνα 10: Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το ένζυμο αυτό σχηματίζει ομοδιμερές: μια υπομονάδα δείχνεται με λευκό και η άλλη με κίτρινο. Κάθε καταλυτικό κέντρο περιέχει μια ομάδα φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), συνδεδεμένη με τη λυσίνη 680 του ενζύμου. Σημειώνεται η θέση πρόσδεσης του ενζύμου.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *in vitro* απαντάται είτε ως διμερές είτε ως τετραμερές, μορφές που προκύπτουν από μια αντιστρεπτή αντίδραση πολυμερισμού/αποπολυμερισμού κατά την ενεργοποίηση ή τη σύνδεση αναστολέων στη T διαμόρφωση. Ωστόσο, *in vivo* ένα μικρό μόνο ποσοστό του ενζύμου υφίσταται με τη μορφή τετραμερούς, γιατί η σύνδεση του γλυκογόνου διασπά τα τετραμερή. Η φωσφορυλάση των σκελετικών μυών εμφανίζει τετραμερισμό, αφού τα διμερή της φωσφορυλάσης που προέρχονται από το ήπαρ δεν τετραμερίζονται (Oikonomakos *et al.*, 1989). *In vitro* η μορφή α είναι τετραμερές ενώ η μορφή β είναι διμερές το οποίο τετραμερίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, κατά την ενεργοποίηση του παρουσία AMP και Glc-1-P, ενώ η α διμερίζεται παρουσία γλυκόζης (Oikonomakos *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1965). Η μετάβαση της μυϊκής φωσφορυλάσης από την T διαμόρφωση στην R έχει ως αποτέλεσμα τον τετραμερισμό του ενζύμου ο οποίος εξαρτάται από το pH, τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ (Dombradi 1981; Leonidas *et al.*, 1992).

Κρυσταλλογραφικές μελέτες, που έγιναν σε κατάλληλες συνθήκες ανάλογα με τη δομή, τόσο στη GPb όσο GPa, σε T και R διαμόρφωση βοήθησαν στο δομικό χαρακτηρισμό του ενζύμου (*Johnson et al. 1974, Oikonomakos et al. 1985, Barford and Johnson 1989*).

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει ελλειψοειδές σχήμα και αποτελείται από α-έλικες (52 %), β-πτυχωτές επιφάνειες (20 %), δύο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα και μια έλικα π μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια επικράτεια 95 αμινοξέων (153-248) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 111 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή.

Το συνένζυμο PLP που είναι απαραίτητο, βρίσκεται εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας και είναι συνδεδεμένο με τη Lys680 της έλικας α21. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο διαλύτης που το περιβάλλει έχει πρόσβαση σε αυτό μόνο μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å.

Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Για να σχηματιστεί το αλλοστερικό κέντρο δυο α-έλικες και τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες σχηματίζουν μια εσοχή η οποία σφραγίζεται από την περιοχή *car'* της συμμετρικής υπομονάδας (*Oikonomakos 2002*). Στο αλλοστερικό κέντρο έχει βρεθεί ότι μπορούν να συνδεθούν ισχυρά τριτερπενοειδής ενώσεις από εκχυλίσματα φυτών, όπως το ασιατικό και το μασλινικό οξύ (*Wen et al., 2008*).

Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στη διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb που σχηματίζεται από την ένωση των δύο υπομονάδων, απέχει 15 Å από το αλλοστερικό, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Οι αναστολείς που προσδένονται σε αυτό το κέντρο σύνδεσης δρουν ως αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας τη διαμόρφωση T του ενζύμου και εμφανίζουν συνεργατικότητα με άλλους αναστολείς όπως είναι η γλυκόζη (*Oikonomakos et al., 2000; Rath et al., 2000*).

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης προσδιορίστηκε πρόσφατα από κρυσταλλογραφικές μελέτες (*Kantsadi et al., 2014*) και βρίσκεται 15 Å από το καταλυτικό, 43 Å από το αλλοστερικό και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Η πρόσδεση αυτού του μορίου προέγει μια λιγότερο δραστική διαμόρφωση T του ενζύμου μέσω σταθεροποίησης του βρόχου 280s στη διαμόρφωση T της rmGPb, εξηγώντας έτσι την ανασταλτική δράση της (*Kantsadi et al., 2014*).

Το κέντρο αναστολής εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρο και σε απόσταση 10 Å από αυτό. Εκεί έχει βρεθεί ότι προσδένονται εκτός από την AMP, η αδενίνη, η καφεΐνη, νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, ινoσίνη), νουκλεοτίδια (IMP, ATP, NADH),

φλαβονοειδή και κάποιες ετεροκυκλικές ενώσεις (*Oikonomakos et al., 2000; Kasvinsky et al., 1978*). Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε αυτή τη θέση προσδένονται το ελλαγικό και το γαλλικό οξύ με τρόπο παρόμοιο με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, με το ελλαγικό οξύ να παρουσιάζεται ως ένας βιοδραστικός αναστολέας φυσικής προέλευσης που προσδένεται στο κέντρο αναστολής της rmGP (*Kyriakis et al., 2015*).

Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό. Στο κέντρο αυτό έχει μελετηθεί η σύνδεση της α-, β-, γ-κυκλοδεξτρίνης, της μαλτοπενταόζης και τη μαλτοεπταόζης (*Pinotsis et al., 2003*).

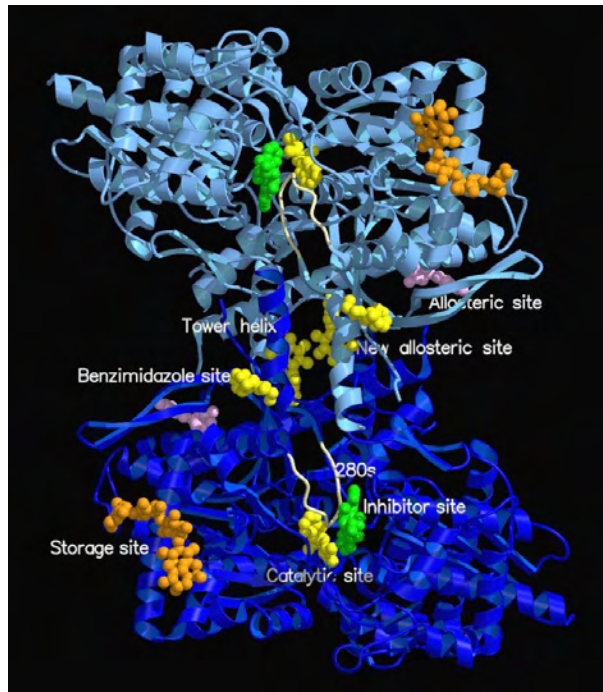
Κέντρα σύδεσης του ενζύμου

Ο προσδιορισμός των κρυσταλλικών δομών της GP ως σύμπλοκα με αναστολείς, υποστρώματα και ενεργοποιητές υπέδειξε την ύπαρξη 7 κέντρων σύνδεσης υποκαταστατών γνωστά ως (Εικόνα 13):

- κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14
- καταλυτικό κέντρο
- αλλοστερικό κέντρο (ή κέντρο νουκλεοτιδίων)
- κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών (ή αποθηκευτικό κέντρο)
- κέντρο αναστολής
- κέντρο σύνδεσης κερσετίνης
- νέο αλλοστερικό κέντρο.

Τα επτά αυτά κέντρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για το σχεδιασμό αναστολέων της GP. Τα κέντρα αυτά δεν αυτά δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα τρία ισοένζυμα φωσφορυλάσης τα οποία προέρχονται από τους μυς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η ηπατική φωσφορυλάση εμφανίζει 80 % ομολογία (ως προς την αμινοξική αλληλουχία) με τη μυϊκή, όμως η ομολογία των δύο ενζύμων είναι 100 % στο ενεργό κέντρο σύνδεσης της γλυκόζης και στο νέο αλλοστερικό κέντρο (*Oikonomakos et al., 2000*). Από μελέτες μοντελισμού (*Rath et al., 1987; Board et al., 1995*) διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ της ηπατικής GP του ανθρώπου και της μυϊκής GP του κουνελιού στην περιοχή του αλλοστερικού κέντρου σύνδεσης του AMP και στο κέντρο αναστολής, ενώ μικρές μεταβολές παρατηρήθηκαν μόνο στην περιοχή του αποθηκευτικού κέντρου (τα αμινοξέα Gln401, Arg409 και

Val431 του μυϊκού ενζύμου έχουν αντικατασταθεί στην περίπτωση της ανθρώπινης ηπατικής GP από τα Glu401, Lys409 και Ile431, αντίστοιχα) που φαίνεται όμως ότι δεν επηρεάζουν τη συγγένεια σύνδεσης της πρωτεΐνης με το γλυκογόνο (*Maddaiah and Madsen, 1996*).



Εικόνα 11: Διάγραμμα του διμερούς μορίου της GPb στο οποίο υποδεικνύονται τα κέντρα σύνδεσης των διαφόρων τροποποιητών

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως αλλοστερικό ένζυμο

Η φωσφορυλάση είναι μια κλασική πρωτεΐνη-ένζυμο, η οποία υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια που έχει χαμηλή δραστικότητα και χαμηλή συγγένεια με το υπόστρωμα, φωσφορυλάση του γλυκογόνου b (GPb) και μια που έχει υψηλή δραστικότητα και υψηλή συγγένεια με το υπόστρωμα, φωσφορυλάση του γλυκογόνου a (GPa). Σε περιόδους ηρεμίας η φωσφορυλάση βρίσκεται κυρίως στη μορφή b ενώ στην a βρίσκεται περίπου το 10 % του συνολικού ενζύμου.

Οι ιδιότητες της GP ρυθμίζονται με αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις από αλλοστερικούς τροποποιητές, ενώσεις δηλαδή που διαφέρουν από το υπόστρωμα (π.χ. AMP, Glc-6-P και γλυκόζη). Οι αλλοστερικές ιδιότητες αυτές μπορούν να εξηγηθούν με βάση το πρότυπο των Monod-Wyman-Changeaux ή MWC ή «Συμμετρικό πρότυπο» (*Monod et al., 1965*) για τις αλλοστερικές πρωτεΐνες. Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό, το ένζυμο υπάρχει σε δύο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις στο διάλυμα, την T και την R, που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους.

Η κύρια οδός για την ενεργοποίηση ή αναστολή της δράσης του ενζύμου είναι η μετατροπή της φωσφορυλάσης b σε φωσφορυλάση a με φωσφορυλίωση της Ser-14 από μια ειδική κινάση (την κινάση της φωσφορυλάσης) ή τη μετατροπή της φωσφορυλάσης από a σε b με την αποφωσφορυλίωση της Ser-14 από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), αντίστοιχα (*Cohen 1973, Cohen 1983*). Η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b και η μετατροπή της σε a έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP, αν και η δραστηριότητά του μπορεί να αυξηθεί επιπλέον με την παρουσία AMP (*Leonidas et al., 1990*).

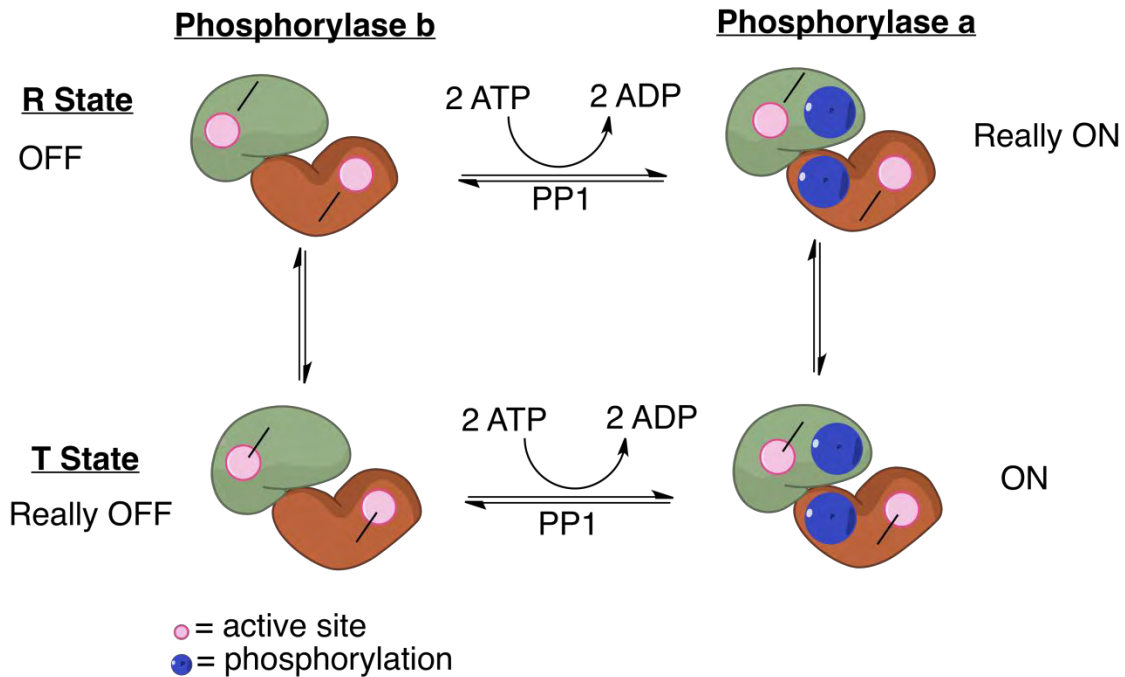
Η φωσφορυλάση ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης.

Κάθε μια από αυτές τις ισομορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T.

Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R συνεπάγεται μια στροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς. Περισσότερο σημαντικό είναι ότι η μετάβαση αυτή συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι, η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργός διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ανιόν είναι καλά οργανωμένη.

Η T διαμόρφωση εμφανίζει μικρή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους αλλοστερικούς ενεργοποιητές και υψηλή συγγένεια για τους αναστολείς, ενώ, η R διαμόρφωση εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους ενεργοποιητές και μικρή συγγένεια για τους αναστολείς. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του προτύπου

είναι ότι ισχύει πάντα η συνθήκη συμμετρίας, δηλαδή αφ' ενός μεν υπάρχει ένας άξονας συμμετρίας μεταξύ των υπομονάδων στο μόριο, αφ' ετέρου δε η αλλαγή της διαμόρφωσης της μιας υπομονάδας προκαλεί συμμετρική αλλαγή στη διαμόρφωση και των άλλων υπομονάδων.



Εικόνα 12: Ρύθμιση της φωσφορυλάσης. Η φωσφορυλάση a και b βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού κατάστασης R και μιας λιγότερο ενεργού κατάστασης T. Η φωσφορυλάση b είναι συνήθως ανενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση a είναι συνήθως ενεργός διότι η ισορροπία ευνοεί την κατάσταση R.

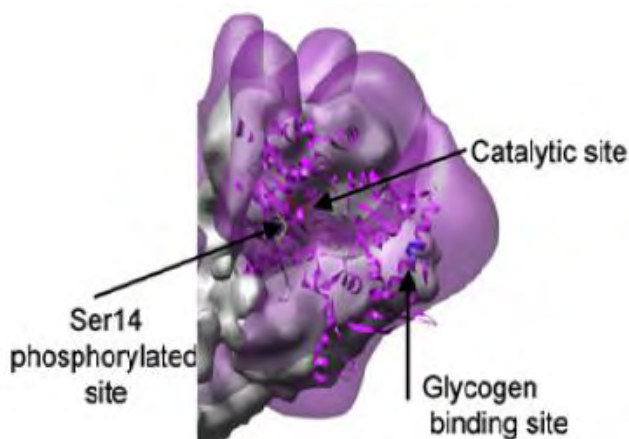
Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στη διαμόρφωση R. Η σύνδεση της AMP προσδίδει στη μυϊκή GPb δραστηριότητα που είναι ίση περίπου με το 80 % της δραστηριότητας της GPa. Αυτός ο μηχανισμός είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς η GPb μπορεί να συμμετάσχει στη γλυκογονόλυση όταν τα επίπεδα της AMP είναι αυξημένα κατά τη διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. Η ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος της AMP, ευνοώντας τη διαμόρφωση T. Επομένως, η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από τη διαμόρφωση T στη διαμόρφωση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών

επιδράσεων της ATP. Αντίθετα, η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα των AMP και ATP.

Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Phk)

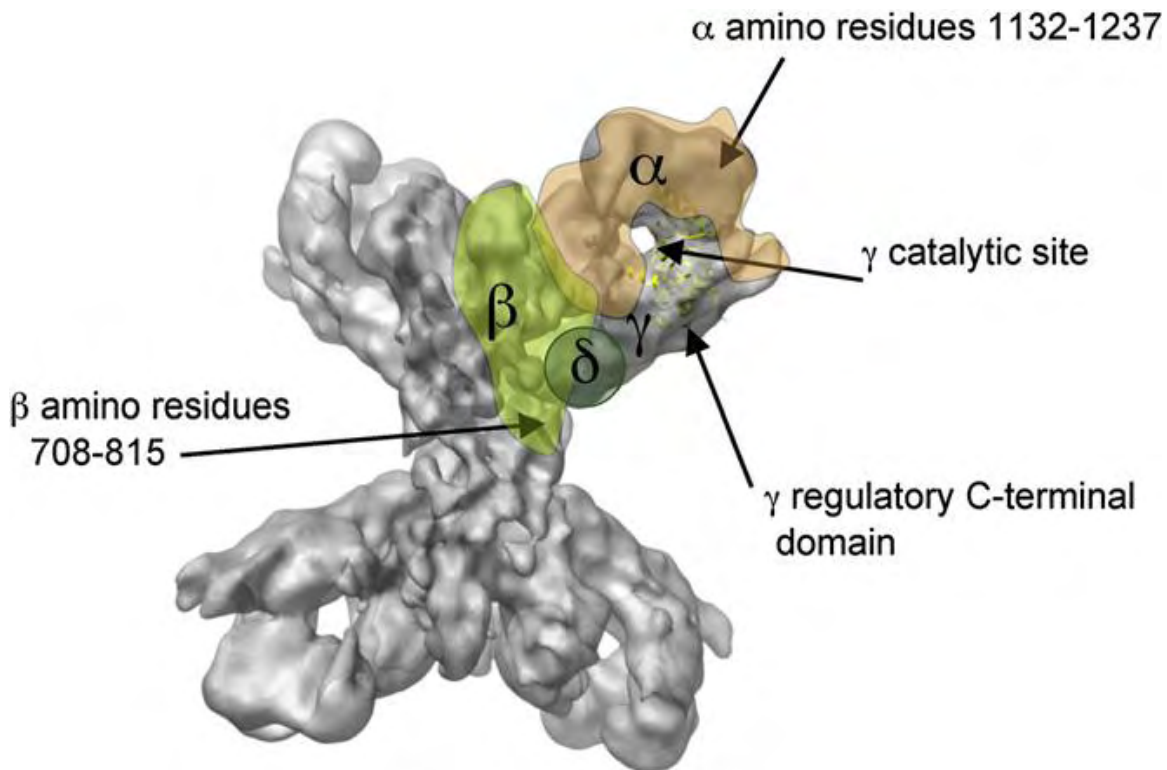
Η μυϊκή κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ένζυμο-κλειδί στον έλεγχο του καταβολισμού του γλυκογόνου, ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε δομικά και έχει μοριακό βάρος $1,3 \times 10^3 \text{Da}$ (Hayakawa *et al.*, 1973; Cohen, 1973). Είναι ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες (αβγδ)₄ με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς. Οι υπομονάδες α (138 kDa) και η β (125 kDa) είναι ομόλογες και έχουν ρόλο ρυθμιστικό. Αυτοφωσφορυλίωση ή φωσφορυλίωση αυτών των υπομονάδων από την εξαρτώμενη από την κυκλική AMP κινάση αποκρινόμενη σε ορμονική διέγερση οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης.

Η γ υπομονάδα είναι η καταλυτική και αλληλεπιδρά με τη δ υπομονάδα που είναι παρόμοια με την καλμοδουλίνη και έχει την ικανότητα να συνδέει μόρια ασβεστίου προσδίδοντας έτσι στο ένζυμο ευαισθησία στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Η καλμοδουλίνη έχει διπλή λειτουργία (Hessova *et al.*, 1985) στην κινάση καθώς όταν είναι συνδεδεμένη με ασβέστιο ενεργοποιεί το ένζυμο ενώ ελεύθερη από ασβέστιο αλληλεπιδρώντας με την γ υπομονάδα αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου. Οι α και β υπομονάδες έχουν ρυθμιστικό ρόλο και υπόκεινται σε πολλαπλές φωσφορυλιώσεις (Cohen 1973).



Εικόνα 13: Η καταλυτική περιοχή της γ υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Είναι μία από τις περισσότερες κινάσες που δεν απαιτούν φωσφορυλίωση ενεργού κέντρου προκειμένου να ενεργοποιηθεί (Lowe *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 1995). Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βρίσκεται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών αλλά εντοπίζεται πολύ συχνά στους μυς και το ήπαρ, όπου κυρίως μεταβολίζει το γλυκογόνο.



Εικόνα 14: 3D σχηματική απεικόνιση της δομής της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, όπου φαίνεται το καταλυτικό κέντρο της γ υπομονάδας.

Ο ρόλος του ενζύμου στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου είναι η μετατροπή της ανενεργής GPb απουσία AMP σε ενεργή GPa. Κατά τη φωσφορυλίωση μεταφέρεται η γ φωσφορική ομάδα του ATP στη σερίνη 14, της GPb. Η ενεργή μορφή α καταλύει τη φωσφορυλίωση του γλυκογόνου απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια μεταβολίζεται στο κύτταρο.

Η υψηλή ειδική δραστηριότητα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου την κάνει ένα πιθανό στόχο φαρμάκων που εμπλέκονται με το μεταβολισμό του

γλυκογόνου, όπως συμβαίνει στο διαβήτη τύπου II (N.G.Oikonomakos *et al.*, 1999; N. Bischler *et al.*, 2011).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Διάφορες μελέτες που έχουν ως στόχο τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 προτείνουν την παρασκευή αναστολέων (Aiston *et al.* 2001, 2003; McCormack *et al.* 2001; Treadway *et al.* 2001) που προσδένονται στο καταλυτικό και αλλοστερικό κέντρο, στο νέο αλλοστερικό κέντρο και στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Somsák *et al.* 2001, 2003; Treadway *et al.* 2001; Oikonomakos 2002; Kurukulasuriya *et al.* 2003). Το ένζυμο έχει καθοριστικό ρόλο στον ανθρώπινο μεταβολισμό και σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Για το λόγο αυτό η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση αποτελεί στόχο για την ανακάλυψη υπογλυκαιμικών σκευασμάτων. Οι περισσότερες έρευνες για το σχεδιασμό αποτελεσματικών αναστολέων της GP στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο ενζύμου, το οποίο αποτελεί θέση πρόσδεσης του φυσικού αναστολέα του ενζύμου που είναι η α-D-γλυκόζη.

Με τη χρήση τρισδιάστατων δομών ενζύμου-αναστολέα αποκαλύπτονται οι αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικοί στην αναγνώριση και στην πρόσδεση του αναστολέα καθοδηγώντας το σχεδιασμό νέων αναστολέων (Kantsadi *et al.*, 2012; Hayes and Leonidas 2010).

Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά σκευάσματα

Η χρήση των φαρμακευτικών φυτών ως θεραπεία για τον Σακχαρώδη Διαβήτη, έχει ξεκινήσει πολλά χρόνια πριν. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα με τα φυτικά φάρμακα είναι ότι τα δραστικά συστατικά τις περισσότερες φορές είναι αδιευκρίνιστα. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τα δραστικά συστατικά αυτών των φαρμάκων, καθώς και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις, τα οποία θα βοηθήσουν στην ανάλυση της θεραπευτικής τους αποτελεσματικότητας και την «τυποποίηση» του φαρμακευτικού σκευάσματος.

Οι συμβατικές θεραπείες για το Διαβήτη, όπως είναι τα ανάλογα γουανιδίνης (μετφορμίνη), οι ευαισθητοποιητές ινσουλίνης, έχουν σημαντικές παρενέργειες ως προς το μηχανισμό με τον οποίο δρουν. Τέτοια παραδείγματα είναι η αύξηση του

σωματικού βάρους, η καρδιαγγειακή αθηροσκλήρωση, η περιορισμένη αποτελεσματικότητα και η ανεκτικότητα. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά η μελέτη για φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία στηρίζονται σε φυτικά εκχυλίσματα, τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες πολικών και ευταία χρόνια έχουν βρεθεί αρκετές ενώσεις οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Hayes et al., 2014). Όμως δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στον τρόπο δράσης καθώς δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης στη GP, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τη κερσετίνη (Kantsadi et al., 2014).

Τα κλάσματα των εκχυλισμάτων προήλθαν από τα φυτά: *Camellia sinensis*, *Psichotria frasistipeda*, *Quercus suber*, *Dryopteris tokyoensis*, *Phyllanthus embilica* και *Ilex verticillata*.

Camellia sinensis

Το τσάι από το φυτό *Camellia sinensis* είναι το παλαιότερο ήπιο διεγερτικό ρόφημα που περιέχει καφεΐνη. Τα φύλλα του τσαγιού αυτού περιέχουν περισσότερες από 700 χημικές ουσίες μεταξύ αυτών φλαβινοειδή, βιταμίνες (B,C,E,K), αμινοξέα, καφεΐνη, πολυσακχαρίτες που είναι σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία (Mondal et al., 2004). Από τη πρόσφατη βιβλιογραφία τονίζεται η σημασία του στην καθημερινή διατροφή καθώς και η αξία του στην πρόσληψη ασθενειών (Muktar and Ahmad 1999, 2000 and Weisburger 1997).

Psichotria frasistipeda

Είδη του γένους *Psychotria* όπως είναι τα *P. carthagenensis* και *P. capillacea* έχουν μελετηθεί και φαίνεται ότι τα εκχυλίσματά του έχουν υψηλή συγκέντρωση φαινολών, φλαβινοειδών και συμπυκνωμένης τανίνης. Επίσης, μέσω ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας HPLC/PAD αποκαλύφθηκε η ύπαρξη p-κουμαρικού οξέος (Formagio A. et al., 2014).

Quercus suber

Quercus suber ονομάζεται ο φελλός της βελανιδιάς και πρόκειται για ένα μεσαίου μεγέθους αειθαλούς δέντρου που εγγενές στη νοτιοδυτική Ευρώπη και την βορειοδυτική Αφρική. Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται κυρίως για τη δημιουργία πώματος δε μπουκάλια κρασιού και την κατασκευή δαπέδων φελλού. Πρόσφατες μελέτες που έγιναν σε εκχυλίσματα φύλλων έδειξαν ότι όταν στο εκχύλισμα υπάρχει μεθανόλη τότε η συγκέντρωση των φαινολών και των φλαβινοειδών είναι αυξημένη

ενώ, όταν τα εκχυλίσματα είναι υδατικά τότε υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση τανίνης. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα φύλλα αυτού του φυτού περιέχουν ενώσεις σημαντικές για τη μείωση των συμπτωμάτων νευροεκφυλιστικών ασθενειών και του διαβήτη (*Custódio L. et al., 2015*).

Phyllanthus embilica

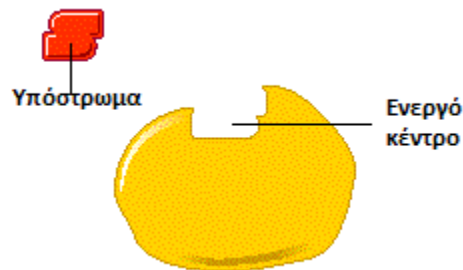
Οι καρποί του δέντρου *Phyllanthus embilica* (ή *Embllica officinals*, της οικογένειας *Euphorbiaceae*) είναι ευρέως γνωστοί στην Ασία και την Αφρική. Είναι πηγή βιταμίνης C, μετάλλων και αμινοξέων. Μελέτες που έγιναν σε διαβητικούς αρουραίους που τους χορηγήθηκε εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Phyllanthus embilica* έδειξαν ότι μειώθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, μειώθηκαν τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και βελτιώθηκε η λειτουργία του ήπατος μέσω ομαλοποίησης της δραστηριότητας του ηπατικού ενζύμου τρανσαμινάση της αλανίνης (ALT), χωρίς να έχει κάποια τοξική δράση για τον οργανισμό (*Shamim A. et al., 2009*). Επιπλέον, το φυτό αυτό περιέχει τανίνες και όπως έχει αποδειχθεί μπορεί μέσω αναστολής της αλδολικής αναγωγάσης να αντιμετωπισθούν οι διάφορες επιπλοκές που προκύπτουν από το διαβήτη (*Suryanarayana P. et al., 2004*). Τέλος, περιέχει 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (gallic acid), το οποίο παράγεται από τις τανίνες μέσω ενζυμική υδρόλυσης και έχει αντιδιαβητική δράση μέσω των β-κυττάρων του παγκρέατος διεγείροντας την έκκριση ινσουλίνης και μειώνοντας τη δυσανεξία στη γλυκόζη (*Fatima, N., Hafizur, R.M., Hameed, A. et al., 2015*).

Είδη του γένους *Ilex* είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και έχουν χρησιμοποιηθεί σε έρευνες προκειμένου διερευνηθεί η δράση ενάντια στην παχυσαρκία και το διαβήτη με θετικά αποτελέσματα (*Hemmer H. et al., 1997; Young-Rye K. et al., 2012*).

Το μοντέλο Michaelis-Menten και οι κινητικές ιδιότητες των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, στις οποίες η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίζεται γενετικά. Τα ένζυμα έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο στην αντίδραση που καταλύουν όσο και στην επιλογή των αντιδρώντων, που ονομάζονται υποστρώματα. Ως καταλύτης ορίζεται κάθε ένωση που επηρεάζει την ταχύτητα διεξαγωγής μίας χημικής αντίδρασης, χωρίς να εμφανίζεται στα τελικά της προϊόντα. Ο καταλύτης παραμένει αμετάβλητος στη μάζα μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Οι καταλύτες που παράγονται και χρησιμοποιούνται από τους ζωντανούς οργανισμούς είναι οργανικής φύσης και ονομάζονται ένζυμα.

Τα ένζυμα καταλύουν μόνο εκείνες τις αντιδράσεις που είναι θερμοδυναμικά δυνατές (αυτές που συνοδεύονται από μείωση της ελεύθερης ενέργειας). Με τη δράση του ενζύμου σχηματίζεται ένα σύνθετο μόριο (σύμπλοκο) μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος ή υποστρωμάτων. Το σύνθετο αυτό μόριο στη συνέχεια διασπάται και παράγεται το προϊόν της αντίδρασης και το αμετάβλητο ένζυμο. Τα σύμπλοκα σχηματίζονται μεταξύ υποστρώματος και λίγων περιοχών της επιφάνειας του ενζύμου. Η περιοχή του ενζύμου στην οποία συνδέεται το υπόστρωμα, προκειμένου να υποστεί τροποποίηση, ονομάζεται *ενεργό κέντρο* ή *ενεργός περιοχή*.

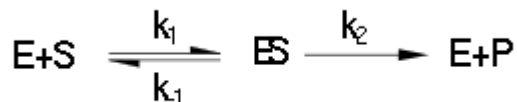


Εικόνα 15: Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος μέχρι να επιτευχθεί μια μέγιστη (V_{max}). Σε αυτό το σημείο όλες οι θέσεις αντίδρασης είναι του ενζύμου (ενεργά κέντρα) είναι κατειλημμένες.

Σε ένα σύστημα όπου το ένζυμο βρίσκεται σε περίσσεια και η συγκέντρωση παραμένει σταθερή, κάθε αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος αυξάνει την ταχύτητα της αντίδρασης. Η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένα ένζυμο συνήθως εκφράζεται με τη σταθερά K_m των *Michaelis-Menten*. Η σταθερά αυτή ορίζεται ως η μοριακή συγκέντρωση του υποστρώματος κατά την οποία το 50 % των ενεργών κέντρων του ενζύμου καταλαμβάνεται από το υπόστρωμα και ο ρυθμός της αντίδρασης είναι το μισό του μέγιστου. Εκτός της τιμής K_m , η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αντίδραση μειώνεται, καθώς προσεγγίζει το μέγιστο της συγκέντρωσης. Για συγκεντρώσεις υποστρώματος μικρότερες του K_m κάθε αύξηση στη συγκέντρωση προκαλεί αύξηση στο ρυθμό της αντίδρασης. Όταν οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερες από το K_m του ενζύμου, τότε το υπόστρωμα δεν αποτελεί πλέον τον καθοριστικό παράγοντα στη συγκεκριμένη μεταβολική διαδικασία.

Το μοντέλο *Michaelis-Menten* δίνει πληροφορίες για τις κινητικές ιδιότητες μερικών ενζύμων. Στο μοντέλο αυτό, ένα ένζυμο (E) συνδυάζεται με ένα υπόστρωμα (S) για να

σχηματίζουν ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), το οποίο μπορεί να σχηματίσει ένα προϊόν (P) ή να διασπαστεί σε E και σε S.



Εικόνα 16: Ένα ένζυμο E αντιδρά με το υπόστρωμα S για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ES με μια κινητική σταθερά k_1 . Το σύμπλοκο ES μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους. Μπορεί να διασπαστεί σε E και S με μια κινητική σταθερά k_{-1} , ή να σχηματίσει προϊόν P με μια κινητική σταθερά k_2 .

Η σταθερά Michaelis-Menten, K_m , και η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , απορρέουν άμεσα από τις ταχύτητες της κατάλυσης που μετρώνται σε μια ποικιλία συγκεντρώσεων του υποστρώματος. Ο προσδιορισμός της K_m και της V_{max} συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση των προγραμμάτων προσομοίωσης δεδομένων με τη βοήθεια ενός υπολογιστή. Η τιμή της K_m για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Έτσι, η K_m παρέχει ένα μέτρο της συγκέντρωσης του υποστρώματος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί σημαντική κατάλυση.

Πολλά και ποικίλα υποστρώματα μπορούν να δρουν ως παρεμποδιστές της ενεργότητας των ενζύμων.

Τύποι ενζυμικής παρεμπόδισης:

- ανταγωνιστική παρεμπόδιση, μόρια που παρόμοια με εκείνα του υποστρώματος ανταγωνίζονται με αυτά για το ενεργό κέντρο του ενζύμου, με το οποίο δεν συνδέονται μόνιμα
- μη ανταγωνιστική παρεμπόδιση, ένα μόριο συνδέεται με το ένζυμο αλλά σε άλλη θέση από εκείνη του ενεργού κέντρου, με τον τρόπο αυτό επηρεάζεται η δομή του ενεργού κέντρου. Η περιοχή αυτή εκτός του ενεργού κέντρου είναι γνωστή ως αλλοστερική περιοχή και το ένζυμο αναφέρεται ως αλλοστερικό
- μη αντιστρεπτή παρεμπόδιση, είναι η διαδικασία κατά την οποία το ένζυμο απενεργοποιείται μόνιμα. Ο μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Παρασκευαστικές Μέθοδοι

Απομόνωση της καταλυτικής γ-υπομονάδας της μυϊκής κινάσης κονίκλων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (γ-PhK) με υπερέκφραση σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* B834

Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* του στελέχους B834 με τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-phk-γ-trunc

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την γ-καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-phk-γ-trunc, ο οποίος έχει εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται μαζί με την τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (GST).

Οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν το χειρισμό βακτηριακών κυττάρων γίνονται υπό στείρες συνθήκες, τα θρεπτικά μέσα παρασκευάζονται με απιονισμένο ύδωρ και αποστειρώνονται πριν τη χρήση. Τέλος, τα αντιβιοτικά αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρων 0.2 μm.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Medium
- Θρεπτικό υλικό LB Agar
- Αντιβιοτικό ανθεκτικότητας βακτηριακών κυττάρων, 34 mg/ml χλωραμφενικόλης (σε διάλυμα αιθανόλης)
- Αντιβιοτικό ανθεκτικότητας του πλασμιδιακού φορέα, 100 mg/ml αμπικιλίνη (σε υδατικό διάλυμα)
- Πλασμιδιακός φορέας pGEX-phk-γ-trunc

- Βακτηριακά κύτταρα E.coli του στελέχους B834
- Τρυβλία Perti

Σε εναιώρημα των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων προστίθενται 30 ng από τον πλασμιδιακό φορέα, που φέρει εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και το γονίδιο για την έκφραση της γ-υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, ακολουθεί ήπια ανάδευση και τα βακτηριακά κύτταρα μαζί με το πλασμίδιο τοποθετούνται για 30 λεπτά σε πάγο. Έπειτα, ακολουθεί θερμικό σοκ των βακτηριακών κυττάρων με επώαση (σε υδατόλουτρο) στους 42 °C, για 45 δευτερόλεπτα. Η αλλαγή στη θερμοκρασία μεταβάλλει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας στο μόριο του DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Το μείγμα τοποθετείται σε πάγο και επωάζεται για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 900 μl θρεπτικού υλικού SOB και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα υπό ανάδευση.

Μετά την επώαση κατάλληλος όγκος της υγρής καλλιέργειας επιστρώνεται σε τρυβλίο Perti με θρεπτικό μέσο LB Άγαρ, στα οποία έχει προστεθεί χλωραμφενικόλη και αμπικιλίνη, το οποίο αποτελεί αντιβιοτικό επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία επωάζονται για 16 ώρες περίπου στους 37 °C. Ο πλασμιδιακός φορέας προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, έτσι οι αποικίες που εμφανίζονται στο τρυβλίο αποτελούνται μόνο από τα βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο.

Έκφραση της καταλυτικής γ-υπομονάδας της μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (γ-PHK) σε βακτηριακά στελέχη E.coli B834

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Medium
- Θρεπτικό υλικό LB Agar
- Αντιβιοτικά αμπικιλίνη (100 mg/ml) και χλωραμφενικόλη (35 mg/ml)
- Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα E.coli B834
- Φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.2 μm

- IPTG 1M
- Τρυβλία Petri
- 1 U Βενζονάση

Από τρυβλίο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* B834 μεταφέρεται μία αποικία σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα των 50 ml και εμβολιάζονται 10 ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB Agar στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη (τελική συγκέντρωση 50 µg/ml) και χλωραμφενικόλη (τελική συγκέντρωση 34 µg/ml) στην οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα η κυτταρική σειρά *E.coli* B834. Η καλλιέργεια αφήνεται για επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση (210 rpm) για 18 ώρες περίπου.

Σε 4 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες (δύο λίτρων η κάθε μία) που περιέχουν θρεπτικό υλικό LB Medium και κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικών (50 µg/ml αμπικιλίνη και 34 µg/ml χλωραμφενικόλη) εμβολιάζονται 10 ml υγρής καλλιέργειας (αναλογία 1/100). Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (210 rpm) για 3 περίπου ώρες. Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 600 nm κάθε μία ώρα μέχρι η οπτική απορρόφηση να φτάσει OD₆₀₀=0.5-0.6. Σε αυτή την τιμή θεωρείται ότι τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το θρεπτικό υλικό LB Medium παρουσία των παραπάνω αντιβιοτικών το οποίο χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια.

Μετά την επώαση, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε πάγο για 30 λεπτά περίπου, με αυτόν τρόπο σταματάει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων ενώ συνεχίζει να παράγεται η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Έπειτα, τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο στους 18 °C για 30 λεπτά, προστίθεται ο επαγωγέας IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM σε κάθε μία φιάλη και η καλλιέργεια επώάζεται στους 18 °C υπό ανάδευση στις 210 rpm για 12-16 ώρες.

Στη συνέχεια, σε 6 πλαστικά δοχεία τύπου falcon των 50 ml μοιράζεται η καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων και φυγοκεντρείται στους 4 °C σε 5000 g για 5 λεπτά. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο (το οποίο πρέπει να είναι όσο δυνατόν διαυγές), στο ίζημα που δημιουργείται έχουν καταβυθιστεί τα βακτηριακά κύτταρα που μας ενδιαφέρουν. Οι φυγοκεντρήσεις συνεχίζονται για όλο τον όγκο της καλλιέργειας.

Λύση των βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που έχει συλλεχθεί επαναδιαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης -lysis buffer- και έπειτα πραγματοποιείται η λύση των βακτηριακών κυττάρων.

Lysis Buffer:

- 50 mM Hepes (4x)
- 0.2 M NaCl
- 5 % Γλυκερόλη
- 0.1 % MTG

Αφού προστεθούν τα παραπάνω και ρυθμιστεί το pH του διαλύματος στο 7.4 προστίθεται PMSF σε τελική συγκέντρωση 1 mM, το οποίο αποτελεί αναστολέα πρωτεασών.

Αρχικά, προστίθεται το διάλυμα λύσης για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος, η ανάδευση γίνεται με τη χρήση γυάλινης ράβδου. Στη συνέχεια, αφού όλο το διάλυμα συγκεντρωθεί σε ένα πλαστικό δοχείο (falcon) προστίθεται 1 μl βενζονάσης (πρωτεάση που χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση όλων των μορφών DNA και RNA χωρίς να έχει πρωτεολυτική δράση), ενώ ακολουθεί ήπια ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

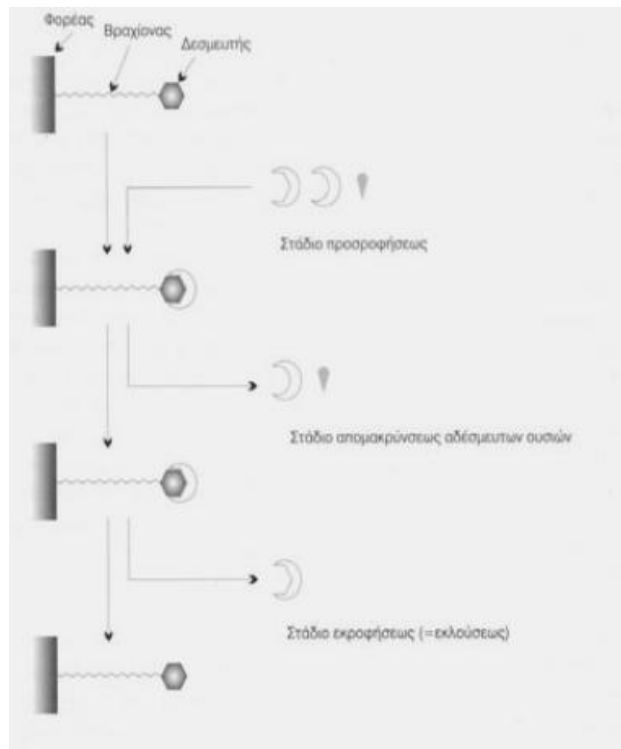
Το διάλυμα ακολούθως υφίσταται την επίδραση των υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων, διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές και η καλλιέργεια βρίσκεται σε πάγο έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση, η οποία θα οδηγούσε σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

Το διάλυμα φυγοκεντρείται στους 6 °C για 45 λεπτά σε 15000 g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το πρωτεϊνικό διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.4 μm.

Καθαρισμός της καταλυτικής γ-υπομονάδας της μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης τους γλυκογόνου (γ-PHK) με χρωματογραφικές μεθόδους

Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography)

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί ένα ιδιαίτερο τύπο χρωματογραφίας που διαχωρίζει πρωτεΐνες μέσω αντιστρεπτής εκλεκτικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης στόχου και του προσδέτη (ligand). Αν κάποιος προσδέτης, π.χ. ενζυμικό υπόστρωμα, μέταλλο κ.α., δεσμευτεί χημικά (ακινητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό θρεπτικό υλικό, το οποίο αποκαλείται φορέας, τότε προκύπτει ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας (affinity adsorbent). Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον προσδέτη θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν στο επόμενο στάδιο της έκπλυσης. Στη συνέχεια, το προσροφημένο μόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με τον προσδέτη (είτε αλλαγή της ιοντικής ισχύος του διαλύτη είτε αλλαγή του pH), με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.



Εικόνα 17: Αρχή και στάδια λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιείται είναι η είναι η GST/4B που φέρει ως προσδέτη την ακινητοποιημένη γλουταθειόνη.

Διάλυμα εξισορρόπησης (A), pH 8.2 – Equilibration buffer:

- 50 mM KH_2PO_4
- 5 % v/v Γλυκερόλη
- 0.1 % w/v MTG
- 200 mM NaCl

Διάλυμα έκλουσης (B), pH 8.2 – Elution buffer:

- 50 mM KH_2PO_4
- 5 % v/v Γλυκερόλη
- 0.1 % w/v MTG
- 200 mM NaCl
- 20 mM GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη)

Στάδια:

- Εξισορρόπηση της στήλης με το διάλυμα A με ρυθμό ροής 0.5 ml/min (10 CV = όγκοι στήλης).
- Εισαγωγή του δείγματος (injection) με ρυθμό ροής 0.3 ml/min. Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.
- Με το διάλυμα εξισορρόπησης (10 CV = όγκοι στήλης) γίνεται έκπλυση (wash), με ρυθμό ροής 0.5 ml/min, της στήλης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί ισχυρά στη στήλη (non-specific binding).
- Έκλυση της πρωτεΐνης με ρυθμό ροής 0.5 ml/min με το διάλυμα B. Η έκλυση της GST συνδεδεμένης με πρωτεΐνη πραγματοποιείται με ελεύθερη γλουταθειόνη στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπό ήπιες συνθήκες μη-μετουσίωσης

που διατηρούν τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η συγγένεια της S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης για την ελεύθερη γλουταθειόνη είναι υψηλότερη σε σχέση με την ακινητοποιημένη στη στήλη, έτσι η ελεύθερη αντικαθιστά την ακινητοποιημένη γλουταθειόνη η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση της GST συνδεδεμένης με πρωτεΐνη. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους (UV) που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και τα κλάσματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώνονται.

- Με την προσθήκη διαλύματος πρωτεάσης 3C σε αναλογία 1/20 w/w πραγματοποιείται διάσπαση του επιτόπου της GST, το πρωτεϊνικό διάλυμα με την πρωτεάση αφήνεται για 16 ώρες στους 4 °C.

Η δεύτερη στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hi-Trap-Blue HP που φέρει ως προσδέτη (ligand) τον Cibacron Blue. Η Hi-Trap-Blue HP στήλη είναι κατασκευασμένη από πολυπροπυλένιο το οποίο είναι βιοσυμβατό, δεν αντιδρά με βιομόρια και συγκρατεί ολιγονουκλεοτίδια. Ο προσδέτης είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με την αгарόζη της στήλης μέσω μιας τριαζίνης του μορίου του. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον προσδέτη μπορούν να δεσμεύονται ή να απελευθερώνονται με υψηλό βαθμό εξειδίκευσης ανάλογα με τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την έκλουση.

Διάλυμα εξισορρόπησης (A), pH 8.2 – Equilibration buffer:

- 50 mM K₂PO₄
- 50 mM NaCl
- 5 % v/v Γλυκερόλη
- 0.1 % w/v MTG

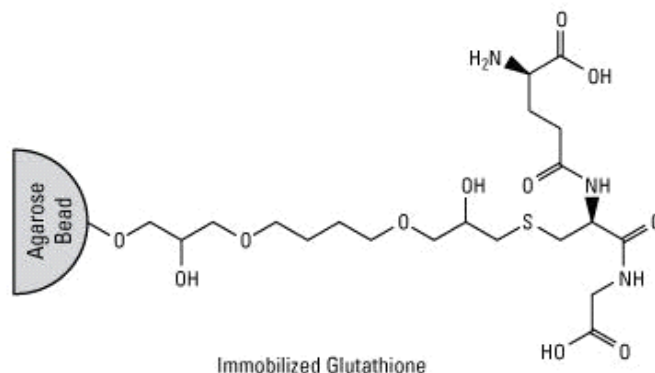
Διάλυμα έκλουσης (B), pH 8.2 – Elution buffer:

- 50 mM K₂PO₄
- 2 M NaCl
- 5 % v/v Γλυκερόλη
- 0.1 % w/v MTG

Στάδια:

- Εξισορρόπηση της στήλης με το διάλυμα Α με ρυθμό ροής 0.5 ml/min ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης.
- Εισαγωγή του δείγματος (injection) με ρυθμό ροής 0.3 ml/min. Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.
- Έκπλυση της στήλης με διάλυμα εξισορρόπησης (Β) με ρυθμό ροής 0.5 ml/min μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί.

Το δείγμα (injection) που προέκυψε μετά τον καθαρισμό από την πρώτη στήλη και πριν την εισαγωγή του στη δεύτερη στήλη επαναδιαλύεται σε διάλυμα pH 8.2 που περιέχει 50 mM KH_2PO_4 , 0.1 % w/v MTG, 5 % v/v Γλυκερόλη.



Εικόνα 18: Χημική δομή της ακινητοποιημένης γλουταθειόνης GSH (Glutathione Agarose)

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης συνεχίζεται με υγρή χρωματογραφία βαρύτητας, GSH-beads agarose. Η πρωτεΐνη που φέρει την “ετικέτα” S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) δεσμεύεται ειδικά με ανοιγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε σχεδόν ουδέτερες, μη μετουσιωτικές συνθήκες.

Στάδια:

- Περνάμε από τη στήλη δις-απεσταγμένο νερό (milli-Q-water) έτσι ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη (τα beads φυλάσσονται σε διάλυμα 20 % v/v αιθανόλης)
- Εξισορρόπηση της στήλης με Buffer A (που είχε χρησιμοποιηθεί στην πρώτη στήλη)
- Εισαγωγή του δείγματος με μικρότερη ροή από το Buffer A
- Έκπλυση της στήλης με Buffer B και συλλογή των κλασμάτων

Μετά το τέλος του χρωματογραφικού καθαρισμού τα κλάσματα έκλουσης με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης συλλέγονται συμπυκνώνονται περνώντας από φίλτρο συμπύκνωσης vinaspin 4 (φυγοκέντρωση σε 4000 g για 2 λεπτά στους 4 °C) το οποίο έχει ανώτατο όριο μοριακού βάρους 10 kDa. Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει είναι περίπου 30 kDa. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που προκύπτει μετά τη συμπύκνωση αποθηκεύεται στους -20 °C αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης με τον όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος, έτσι ώστε η συγκέντρωση της γλυκερόλης να είναι 50 % v/v.

Η έκφραση και ο καθαρισμός πρωτεϊνών είναι κεντρικής σημασίας για μελέτες της δομής και της λειτουργίας. Μετά από κάθε βήμα καθαρισμού κρατάται δείγμα της πρωτεΐνης έτσι ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της. Ο έλεγχος γίνεται με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Επιπλέον, μετά από κάθε στάδιο καθαρισμού γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford, στα κλάσματα έκλουσης που έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης και τα οποία καθαρίζονται επιπλέον σε επόμενο στάδιο. Τέλος, να σημειωθεί ότι όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είτε για εξισορρόπηση της στήλης είτε για έκπλυση της πρωτεΐνης, παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό dH₂O, αποστειρώθηκαν μέσω διήθησης από στείρο φίλτρο 0.41 μm και απαερώθηκαν για 20 λεπτά με τη χρήση υπερύθρων.

Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Αρχή μεθόδου:

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), είναι μια μέθοδος ηλεκτροφόρησης με την οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα, σε πήγμα το οποίο προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου παρουσία SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καθαρότητας διαφόρων παρασκευασμάτων, τον χαρακτηρισμό υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και την εύρεση μοριακών βαρών πρωτεϊνικών αλυσίδων. Το μείγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα SDS, ενός ανιονικού απορρυπαντικού (μόριο με μια υδρόφοβη αλυσίδα και μια αρνητικά φορτισμένη κεφαλή) που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες (τεταρτοταγή και δευτεροταγή δομή) και τις φορτίζει αρνητικά. Έτσι όλες οι πρωτεΐνες κινούνται με βάση το μοριακό τους βάρος. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατή η ανάλυση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος καθώς τώρα θα κινηθούν όλες προς το ίδιο ηλεκτρόδιο (άνοδο), ενώ διαφορετικά οι πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικά σημεία (pI) μεγαλύτερα του 6,8 θα μετακινούνται προς την κάθοδο και θα χάνονταν. Επιπλέον, εκμηδενίζει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και την δημιουργία συμπλόκων.

Το πήγμα πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται κατά τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα με πόρους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τον βαθμό του πολυμερισμού. Ο σχηματισμός πηκτώματος γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμέθυλο-1,2-διάμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το APS, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν τον πολυμερισμό.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης.

Η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοιβάσης (stacking gel) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη επιστοιβάξη των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα και στο πήγμα διαχωρισμού

(separating gel), που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ζώνες κατά την κίνησή τους μέσα σε αυτό. Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το separation gel. Η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιτρέπει στα δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει την ανάλυση καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο.

Πορεία:

- παρασκευή πηγμάτων

Πήγμα διαχωρισμού (separating gel), 12 % (τελικού όγκου 15 ml)

Περιέχει: 4,9 ml dH₂O, 6 ml 30 % acrylamide mix, 3,8 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 150 μl 10 % w/v SDS, 150 μl 10 % w/v ammonium persulfate (APS), 6 μl TEMED

Το μείγμα του πηγματος τοποθετείται ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες συσκευής σταθεροποίησης, οι οποίες απέχουν 1 mm. Προστίθεται H₂O στο πάνω μέρος του πηγματος για την προστασία του από τον αέρα και το μείγμα αφήνεται να πολυμερισθεί σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 25 °C).

Πήγμα επιστοίβασης (stacking gel), 5 % (τελικού όγκου 6 ml)

Περιέχει: 4,1 ml dH₂O, 1 ml 30 % acrylamide mix, 750 μl 1.5 M Tris pH 6.8, 60 μl 10 % w/v SDS, 60 μl 10 % w/v ammonium persulfate (APS), 6 μl TEMED

Απορρίπτουμε το H₂O και μεταξύ των γυάλινων πλακών και πάνω από το πήγμα διαχωρισμού τοποθετείται το πήγμα επιστοίβασης και τοποθετούνται «χτενάκια» ώστε μόλις το πήγμα επιστοίβασης πολυμερισθεί να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων.

* TEMED και APS τοποθετούνται ταυτόχρονα στο τέλος

- *προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση*

Στα δείγματα των πρωτεϊνών που έχουν προκύψει από την έκλυση της στήλης, μετράται η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης (προσδιορισμός κατά Bradford), στη συνέχεια ποσότητα δείγματος μεταφέρεται σε erpendorf και προστίθενται 5-10 μl (ανάλογα το δείγμα) διαλύματος φόρτωσης (loading buffer).

Τα δείγματα θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 95 °C για 5 λεπτά, για να γίνει η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση δείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα «φόρτωσης» πρωτεϊνών το οποίο περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθινόλη και επωάζονται για 5 λεπτά στους 95 °C. Ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der Waals αλληλεπιδράσεων), ενώ η β-μερκαπτοαιθινόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Έτσι, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση δείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

- *ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση ζωνών*

Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα τοποθετείται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (Running Buffer) στη συσκευή, το οποίο περιέχει γλυκίνη, Tris και SDS, το οποίο έρχεται σε επαφή και με το πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 130 Volt μέχρι οι πρωτεΐνες να περάσουν το stacking και να φθάσουν στο separating, στη συνέχεια η τάση ρυθμίζεται στα 180 Volt.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίστηκε για 10 λεπτά σε διάλυμα χρώσης 0,05 % w/c Coomassie (Staining buffer) (40 % v/v μεθανόλη, 10 % v/v acetic acid, dH₂O, 0,1 % w/v Coomassie blue R-250) υπό ανάδευση. Στη συνέχεια ακολουθείται ο αποχρωματισμός του πηκτώματος (Destaining buffer) προκειμένου να αποχρωματισθεί η μη-ειδική χρώση, δηλαδή περιοχές του πηκτώματος που δεν περιέχουν πρωτεΐνη και να παραμείνουν έγχρωμες οι ζώνες μόνο της κατανομής των πρωτεϊνών συστατικών στο πήκτωμα. Το διάλυμα αποχρωματισμού

γίνεται με ανάμειξη οξικού οξέος 10 % v/v και νερού σε αναλογία 1:10, με 3 συνεχείς εκπλύσεις του 1 λεπτού. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας οι ζώνες εμφανίζονται.

Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων βασίστηκε στη μέθοδο των Fischer και Krebs (*Fischer and Krebs, 1962*), με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται σε όλα τα στέδια καθαρισμού 2-μερκαπτο-αιθανόλη αντί L-κυστεΐνης.

Υλικά:

- Τρεις αρσενικοί κόνικλοι μετρίου μεγέθους του είδους *oryctolacus cunicullus*
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλη, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT-διθειοθρεϊτόλη)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα οξικού οξέος 1 mM (CH₃COOH)
- Διάλυμα θειικού αμμωνίου ((NH₄)₂SO₄) κορεσμένο κατά 90 %, 3.6 M
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρεις-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο]/HCl 0.001 M], pH 7.5
- Διάλυμα Tris 2.0 M (χωρίς ρύθμιση του pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M, pH 7.0
- Διάλυμα EDTA 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1 M, pH 7.0
- Γλυκερόλη 100 %
Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1 % w/v NaCO₃ και 10 mM EDTA στους 100 °C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20 % v/v αιθανόλη στους 4 °C.
- Απιονισμένο ύδωρ (dH₂O)
- Υαλοβάμβακας

- Γάζα
- Χάρτινα φίλτρα
- Μεμβράνες διαπίδυσης (Sigma)
- Tubes φυγοκέντρησης
- Πάγος

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Πεχαμετρικό χαρτί
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Υδατόλουτρο
- Αντλία κενού

Παραλαβή μυϊκού ιστού και κατεργασία για την εκχύλιση του ενζύμου

Αρχικά, αφαιρείται ο μυϊκός ιστός από 3 αρσενικά κουνέλια, τοποθετείται σε πάγο, ομογενοποιείται σε κρεατομηχανή και ζυγίζεται. Στη συνέχεια, εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ τρεις φορές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το εκχύλισμα συλλέγεται εν ψυχρώ. Η εκχύλιση ακολουθεί την παρακάτω διαδικασία: Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις (διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία) πραγματοποιούνται με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος του ομογενοποιημένου μυϊκού ιστού. Η τρίτη εκχύλιση πραγματοποιείται με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω υφάσματος/ γάζας αφού έχει προηγηθεί μηχανική θραύση των κυττάρων μέσα στον όγκο του απιονισμένου ύδατος για 8 λεπτά. Τέλος, το εκχύλισμα συλλέγεται εν ψυχρώ και φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

Το pH του διαλύματος που παραλαμβάνεται από το προηγούμενο βήμα ρυθμίζεται σε 5.1-5.2 με την προσθήκη 1N CH_3COOH , υπό ελαφρά ανάδευση. Λόγω της κατακρήμνισης διαφόρων πρωτεϊνών που είναι αδιάλυτες σε όξινο pH, η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται κατά τη ρύθμιση του pH και το εκχύλισμα μεταφέρεται για 5 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν σε θερμοκρασία 0-4 °C σε 5000 rpm για 30 λεπτά.

Το υπερκείμενο υγρό διηθείται με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του αιωρούμενου υλικού. Ακολουθώς ρυθμίζεται το pH του διηθήματος στο 6.8 με κεκορεσμένο διάλυμα KHCO_3 και το διήθημα ογκομετρείται.

Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Η καταβύθιση του ενζύμου γίνεται σε θειικό αμμώνιο 41 % κορεσμού προσθέτοντας θειικό αμμώνιο 90 % κορεσμού με όγκο ίσο προς 0.837 για κάθε λίτρο πρωτεϊνικού διαλύματος και έπειτα το διάλυμα παρέμεινε στους 4 °C για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες το υπερκείμενο αποχύνεται με τη χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται και φυγοκεντρείται σε 5000 rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετείται σε σακουλάκια διαπίδυσης τα οποία εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 1 mM, pH 7.4, υπό ανάδευση και θερμοκρασία 4 °C για μία νύκτα.

Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέγεται από τις μεμβράνες και διαυγάζεται στις 17000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C, Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M pH 7.0 όγκου ίσου με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1 M pH 7.0 με όγκο ίσο με 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και διαλύματος Tris 2 M για τη ρύθμιση του pH στο 8.8. Το μίγμα επώάζεται στους 37 °C για μία ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου για

περίπου 15 λεπτά. Έπειτα προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1 N για τη ρύθμιση του pH στο 7.0 και το μίγμα φυγοκεντρείται σε 17000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετρείται.

Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται μέσω την προσθήκη 1 mL AMP 0.1 M pH 7.0 και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1 M pH 7.0 ανά 100 mL πρωτεϊνικού διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης. Το μίγμα αφήνεται στους 0 °C για τουλάχιστον 6 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Ακολούθως οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 15500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στους 30 °C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στους 30 °C σε όσο το δυνατό λιγότερο όγκο διαλύματος αραίωσης 50:50:1 pH 6.8. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28710 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25-30 °C. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως έγινε στο προηγούμενο βήμα. Το μίγμα αφήνεται ώστε να αναπτυχθούν οι κρύσταλλοι του ενζύμου στους 0 °C για τουλάχιστον 6 ώρες. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης επαναλαμβάνονται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο για άλλες τρεις φορές, με την τελευταία ανακρυστάλλωση να πραγματοποιείται χωρίς την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b αφού συλλεχθούν μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, διαλυτοποιούνται σε διάλυμα 50:50:1 pH 6.8 στους 30 °C. Με τη φωτομέτρηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του.

Τέλος, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C.

B. Αναλυτικές Μέθοδοι

Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Μέθοδος Bradford (Biorad protein assay)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει είτε απευθείας με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, είτε με διάφορες μεθόδους σχηματισμού χρώματος. Η μέθοδος είναι η πλέον διαδεδομένη για τον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα λόγω της ταχύτητας, της ευκολίας και της μεγάλης ευαισθησίας, αφού επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1 mg πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει μήκος κύματος απορρόφησης όταν αυτή δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Η χρωστική προσδένεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, και ιδιαίτερα στην αργινίνη, σχηματίζοντας σύμπλοκο μπλε χρώματος. Σε ελεύθερη μορφή η χρωστική απορροφά σε μήκος κύματος 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική σε μήκος κύματος 595 nm.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA).

Η πρωτεϊνική συγκέντρωση υπολογίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Abs_{595nm} / μg πρωτεΐνης) για την οποία χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα BSA (0,1-0,8 μg).

Φωτομετρικός προσδιορισμός

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας, ανάλογα με το συγκεκριμένο ένζυμο και την αντίδραση που αυτό καταλύει. Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι είναι οι σημαντικότερες και πλέον εύχρηστες και γρήγορες. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έγινε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm.

Η συγκέντρωση του δείγματος μετά τη φωτομέτρηση υπολογίζεται από τη σχέση:

$$A=e \cdot b \cdot C$$

A: απορρόφηση του φωτός

e: σταθερά αναλογίας η οποία ονομάζεται απορροφητικότητα

b: το μήκος διανυθείσας διαδρομής μέσα στο διάλυμα (στην πράξη αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας που είναι συνήθως 1 cm)

C: η συγκέντρωση της ουσίας σε mg/ml

Η σχέση αυτή (γνωστή και ως ο **νομος Beer-Lambert**) αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας: *Η οπτική πυκνότητα (απορρόφηση) για σταθερό πάχος στοιβάδας και ορισμένο μήκος κύματος φωτός είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος της ουσίας που απορροφά.*

Κινητική μελέτη της μυϊκής φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου

Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου, που φυλάσσεται μετά την απομόνωσή του σε γλυκερόλη, παίρνουμε περίπου 10 μl και το αραιώνουμε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Στη συνέχεια, το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός γίνεται με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm (ο συντελεστής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1,32). Ως τυφλό χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης του ενζύμου.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος της φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου (50:50:1) :

Το ρυθμιστικό διάλυμα της φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου έχει pH 6,8 (σε αυτό το pH είναι δραστική η φωσφορυλάση) και αποτελείται από : 50 mM β-φωσφορικής γλυκερόλης (συμβάλει στο να κρατηθεί το pH σταθερό), 1 mM EDTA (αμινοπολυκαρβοξυλικό οξύ, συμπεριφέρεται ως χηλικός παράγοντας σχηματίζοντας σύμπλοκα με μεταλλοϊόντα) και 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη (αναγωγικός παράγοντας) διαλυμένα σε απιονισμένο νερό.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος α-D-Glc-1-P

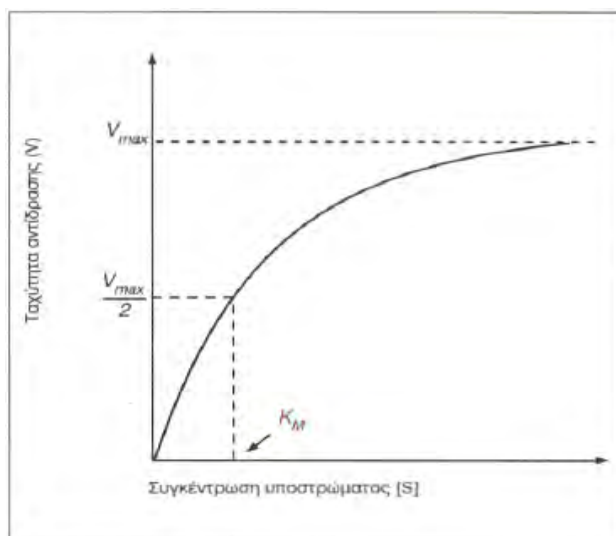
Για την παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος Glc-1-P παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα:

- ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Assay buffer 1): 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA, pH 6.8
- ρυθμιστικό διάλυμα 2 (Assay buffer 2): από αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος 1

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400 mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα 1 προκύπτουν διαλύματα 90 mM, 45 mM, 27 mM, 18mM, 9mM, με την ανάμιξη κατάλληλων όγκων.

Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten ισούται αριθμητικά με εκείνη τη συγκέντρωση υποστρώματος, στην οποία η ενζυμική ταχύτητα είναι ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) της ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή της σταθεράς K_m είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς γίνεται κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων του υποστρώματος (α-D-Glc-1-P).



Εικόνα 19: Διάγραμμα της ταχύτητας V μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$. V_{max} είναι η μέγιστη ταχύτητα και K_m η σταθερά Michaelis-Menten.

Πορεία:

Παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα που περιέχει 3 μg ενζυμικού/ ml, γλυκογόνο 10 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης 10 % (v/v). Στη συνέχεια το μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30 °C για 15 λεπτά. Παρασκευάζονται επίσης διαλύματα υποστρωμάτων α-D-Glc-1-P συγκεντρώσεων 2, 4, 6, 10 και 20 mM με προσθήκη 40 μl από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D-Glc-1-P, 7.2 μl AMP 25 mM, 96.8 μl dH₂O και επωάζονται για 3 λεπτά στους 30 °C.

Μετά την επώαση, για να αρχίσει η αντίδραση, προστίθενται 36 μl ενζυμικού διαλύματος σε κάθε υπόστρωμα. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4 λεπτά) λαμβάνονται 40 μl δείγματος από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθεται σε 10 μl 1 % SDS (w/w).

Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων- Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου $Glycogen_{(n)}$, προς $Glycogen_{(n-1)}$ και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης $Glucose-1-P$.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η αντίθετη αντίδραση. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φωτομετρικά.

Η φασματοφωτομετρία είναι μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού διαφόρων ουσιών και στηρίζεται στη μέτρηση της σχετικής απορρόφησης ακτινοβολίας, που περνά από διάλυμα ουσίας, της οποίας τη συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε. Τα ορθοφωσφορικά αντιδρούν με σύμπλοκα, όπως το μολυβδαινικό αμμώνιο (ammonium molybdate) σχηματίζοντας ενώσεις που απορροφούν στην υπεριώδη και ορατή ακτινοβολία. Με την προσθήκη ammonium molybdate σε δείγμα που περιέχει ανιόντα σχηματίζονται σύμπλοκα τα οποία έχουν πράσινο χρώμα και απορροφούν σε μήκος κύματος 850 nm (*Saheki et al, 1985*).

Παρασκευή διαλύματος 10 % w/v Ασκορβικού οξέος (L-Ascorbic Acid): Διάλυση 2 g σε 20 ml αποσταγμένου ύδατος και ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί. Το διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό για περίπου 1 εβδομάδα.

Παρασκευή διαλύματος 15 mM Μολυβδαινίου και 100 mM ψευδαργύρου: Σε 80 ml απεσταγμένου νερού προστίθενται 1,8 g οξικού διένυδρου ψευδαργύρου (zinc acetate dehydrate). Αφού διαλυθεί ο οξικός ψευδάργυρος προστίθενται 1,5 g Μολυβδαινικού αμμωνίου (Ammonium Molybdate 4-hydrate). Το διάλυμα μπορεί να παραμείνει σταθερό για αρκετούς μήνες.

Πορεία:

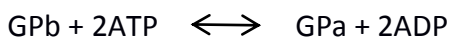
Τα δύο διαλύματα αφού ρυθμιστούν σε pH 5, με πυκνό NaOH το διάλυμα ασκορβικού οξέος και με πυκνό HCl το διάλυμα μολυβδαινίου, αποθηκεύονται σε σκουρόχρωμα γυάλινα δοχεία στους 4 °C. Με έλεγχο του pH αποφεύγονται ανεπιθύμητες δευτερεύουσες αντιδράσεις.

Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται με αναλογία όγκου 4:1 αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το διάλυμα ανάμειξης χρησιμοποιείται μετά από 15 λεπτά όπου φυλάσσεται σε δοχείο μακριά από το φως.

Στα δείγματα που προκύπτουν από την κινητική μελέτη προστίθενται 700 μl από το διάλυμα φωτομέτρησης και ακολουθεί ισχυρή ανάμιξη με vortex. Τα δείγματα τοποθετούνται στους 30 °C για 15 λεπτά και στη συνέχεια φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 850 nm. Επιπλέον, γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών συγκέντρωσης 1 mM.

Μετατροπή της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε a

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b ακολουθεί η μετατροπή στην ενεργό μορφή του ενζύμου, την φωσφορυλάση του γλυκογόνου a. Στο διάλυμα η φωσφορυλάση b έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ενεργοποιητή, που σταθεροποιεί την R διαμόρφωση (π.χ. AMP). Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι το ένζυμο που καταλύει την ομοιοπολική αυτή μετατροπή, απουσία AMP, της ανενεργού μορφής της φωσφορυλάσης b (GPb) στην ενεργή μορφή α (GPα), σε ένα κατάλοιπο σερίνης, Ser14. Η ενεργή μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καταλύει τη φωσφορυλίωση του γλυκογόνου για να απελευθερωθεί 1-φωσφορικής γλυκόζη.



Η φωσφορυλίωση είναι μία αναστρέψιμη ομοιοπολική τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων ενζύμων με φωσφορικές ομάδες, μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του

ATP στην σερίνη 14, της GPb. Η παρασκευή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βασίζεται στη μέθοδο Cohen (Cohen, 1973).

Υλικά:

- Διάλυμα μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου 0.5 mg/ml
- Διάλυμα κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) 10 ng/ml
- Διάλυμα ATP 2 mM
- Διάλυμα αραίωσης της Phk (50 mM Hepes, 5 mg/ml BSA, Dh2o)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Hepes 200 mM (4x), pH 8.2
- Απιονισμένο ύδωρ

Πορεία:

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο όπου η θερμοκρασία διατηρείται στους 30 °C για 3 ώρες. Μετά την επώαση ελέγχεται η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία και απουσία AMP παρουσία υποστρώματος α-D-Glc-1-P. Αύξηση της δραστηριότητας κατά 10-20 % παρουσία AMP θεωρείται ένδειξη της μετατροπής της GPb σε GPα.

Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέων στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου α

Με τη προσθήκη αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης η ταχύτητα σύνθεσης του γλυκογόνου μειώνεται και απελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι φυτικά εκχυλίσματα εμπλουτισμένα με τριτερπένια και πολυφαινολικά, επομένως δεν γνωρίζουμε την ακριβή σύστασή τους και έτσι δεν μπορούμε να ξέρουμε τον τρόπο με τον οποίο αναστέλλει το ένζυμο.

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50 % μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Για τον προσδιορισμό αυτής της σταθεράς μελετάται η δραστηριότητα του ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση του υποστρώματος, G1P (1-φωσφορική γλυκόζη).

Πορεία:

Αρχικά, παρασκευάστηκε το ενζυμικό διάλυμα GPa-γλυκογόνου (με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω) και διάλυμα υποστρώματος α -D-Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης 2 mM και αναστολέα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται στους 30 °C για 15 λεπτά και το υδατικό διάλυμα υποστρώματος-αναστολέα για 3 λεπτά.

Μετά την επώαση των διαλυμάτων μεταφέρονται 36 μ l ενζυμικού διαλύματος στο χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος-αναστολέα ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Έπειτα, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4) λαμβάνονται 40 μ l και μεταφέρονται σε 10 μ l 1 % SDS (w/w), έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση αφού παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μία συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 700 μ l διαλύματος φωτομέτρησης, τα δείγματα επωάζονται στους 30 °C για 15 λεπτά και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των Pi που έχουν απελευθερωθεί από κάθε αντίδραση και ακολουθεί η επεξεργασία δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit. Εκτός από τα δείγματα γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α -D-Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

Παρασκευή τυφλών διαλυμάτων

Προκειμένου να γίνει προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων, θα πρέπει οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν να οφείλονται αποκλειστικά στην αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPa. Για το λόγο αυτό παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά διαλύματα:

- Τυφλό νερού (1 % SDS 10 μ l + 40 μ l dH₂O), για το μηδενισμό του φωτόμετρου

- Τυφλό της συγκέντρωσης α-D-Glc-1-P (1 % w/v SDS 10 μl + 31.1 μl dH₂O + 8.9 μl Glc-1-P), που χρησιμοποιείται λόγω της φυσική υδρόλυσης της
- Τυφλό ενζυμικού διαλύματος (1 % w/v SDS 10 μl + 32 μl dH₂O + 8 μl ενζυμικού διαλύματος), λόγω πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων
- Τυφλό φωσφορικών ιόντων (1 % w/v SDS 10 μl + 30 μl dH₂O + 10 μl 1μmol Pi), το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο διάλυμα από την οπτική απορρόφηση του οποίου υπολογίζεται η τιμή της οπτικής απορρόφησης του κάθε μmol Pi

Εκτός από το τυφλό νερού, όλα τα υπόλοιπα διαλύματα παρασκευάζονται διπλά και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους.

Επεξεργασία φυτικών εκχυλισμάτων

Τα διαλύματα των φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ήταν σε στερεά μορφή και διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO.

Η γενική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε ήταν: από ένα αδρό εκχύλισμα/παρασκεύασμα (crude extract) κάθε φυτού έγιναν διαδοχικά εκχυλίσσεις με αιθέρα (για τα μη-πολικά μόρια), αίθυλοξικό (για τα μέτρια πολικά μόρια), και τετραϋδροφουράνιο (THF-για τα πολύ πολικά μόρια).

Επεξεργασία κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit

Η επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (*Leatherbarrow, 1992*).

Οι οπτικές απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται με την αφαίρεση της τιμής απορρόφησης των τυφλών της Glc-1-P, ενώ από την τιμή της οπτικής απορρόφησης του πρότυπου διαλύματος ορθοφωσφορικών ιόντων προκύπτει η τιμή της οπτικής απορρόφησης του 1 μmol Pi, οπότε όλες οι τιμές των απορροφήσεων ανάγονται σε μmol Pi. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ^2)

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιούνται οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression) και δίνοντας τις τυποκές αποκλίσεις των ταχυτήτων (explicit weighting). Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V = V_{max} [S] / K_m + [S]$$

V: ταχύτητα

V_{max} : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

K_m : σταθερά Michaelis-Menten

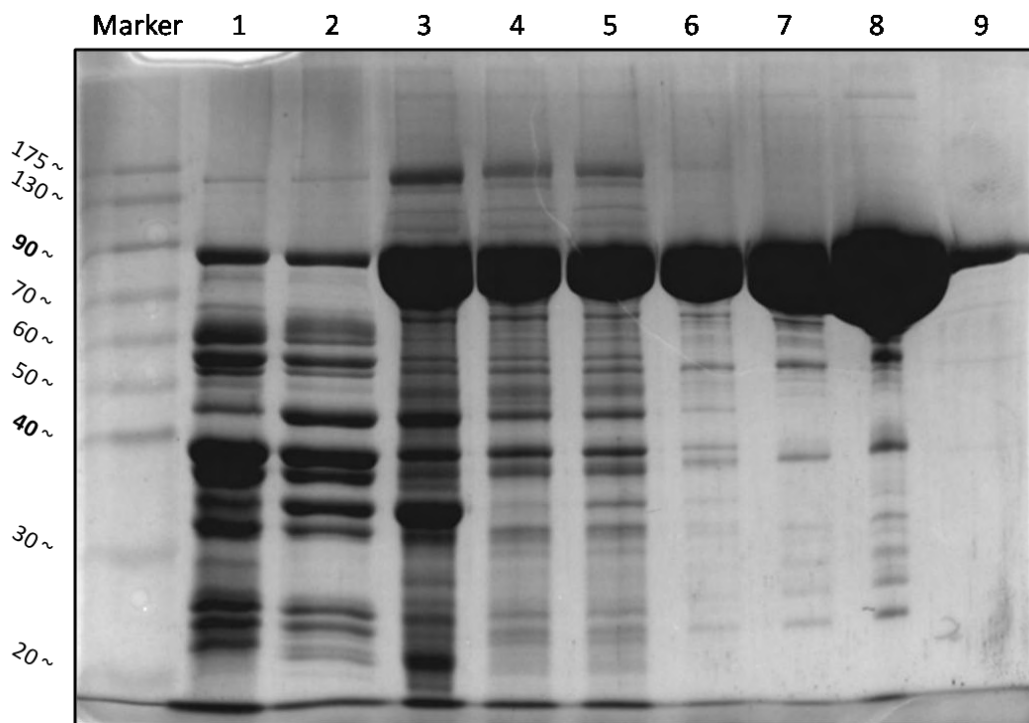
Τέλος κατασκευάζεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει τη μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{max} . Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* από σκελετικούς μύες κονίκλων

Η φωσφορυλάση *b* του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μύς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος.

Μετά το τέλος της απομόνωσης ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 280 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 1838.7 mg/ml, ο συνολικός όγκος της πρωτεΐνης 13.5 ml και η απόδοση της απομόνωσης ήταν 878 mg/kg μυϊκού ιστού.



Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση γέλης 12 % (w/v) πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS δειγμάτων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στη δεύτερη εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στη τρίτη εμφανίζεται πριν τη θερμική

κατεργασία σε υψηλό pH. Στη τέταρτη εμφανίζεται μετά τη θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στη πέμπτη εμφανίζεται μετά την προσθήκη AMP και οξικού μαγνησίου, πριν την κρυστάλλωση. Στην εκτη εμφανίζεται το δείγμα μετά την 1^η ανακρυστάλλωση. Στην έβδομη εμφανίζεται το δείγμα μετά την 2^η ανακρυστάλλωση. Στην όγδοη εμφανίζεται το δείγμα μετά την 3^η ανακρυστάλλωση. Στην τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη GPb.

Απομόνωση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ-PhK)

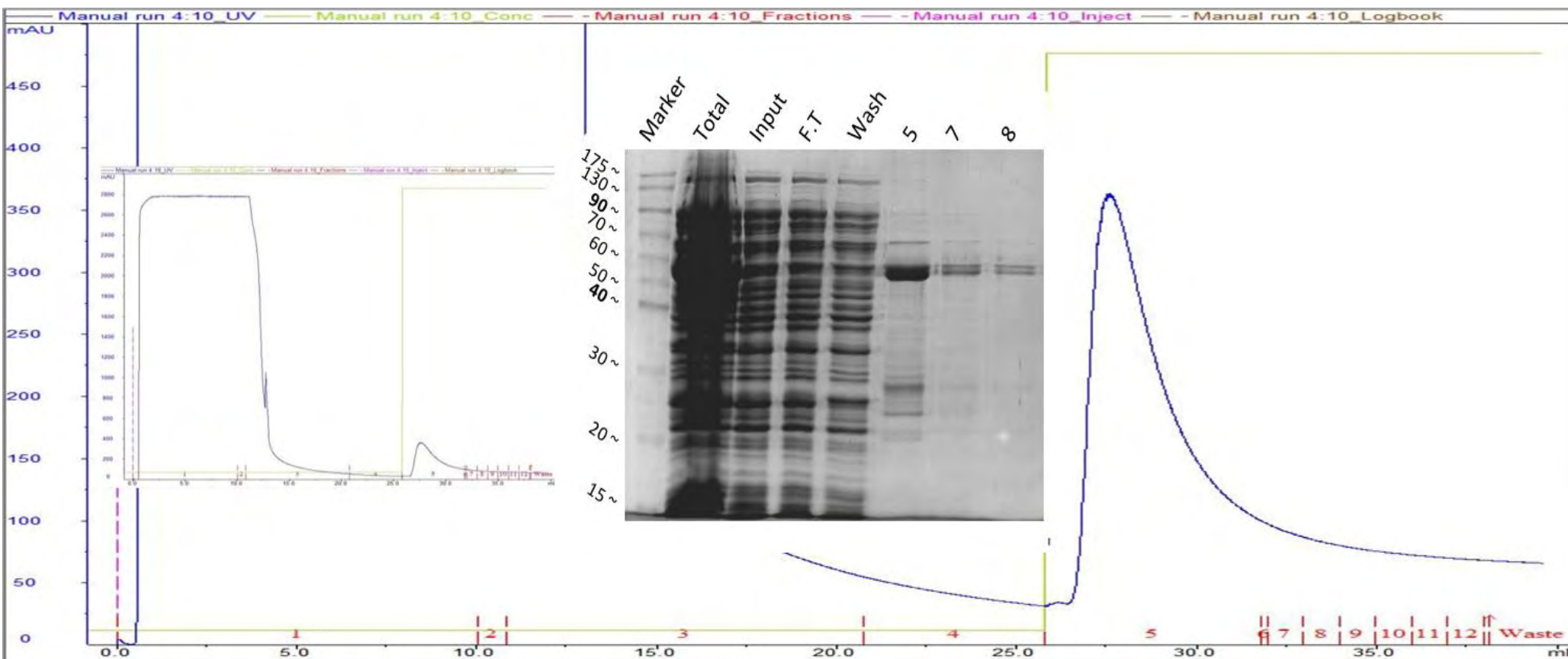
Από βακτηριακά στελέχη έγινε υπερέκφραση και απομόνωση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης. Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφικές μεθόδους, μετά από κάθε στάδιο καθαρισμού έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης (με τη μέθοδο Bradford) και έλεγχος της καθαρότητάς της μέσω ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE).

1η χρωματογραφία συγγένειας

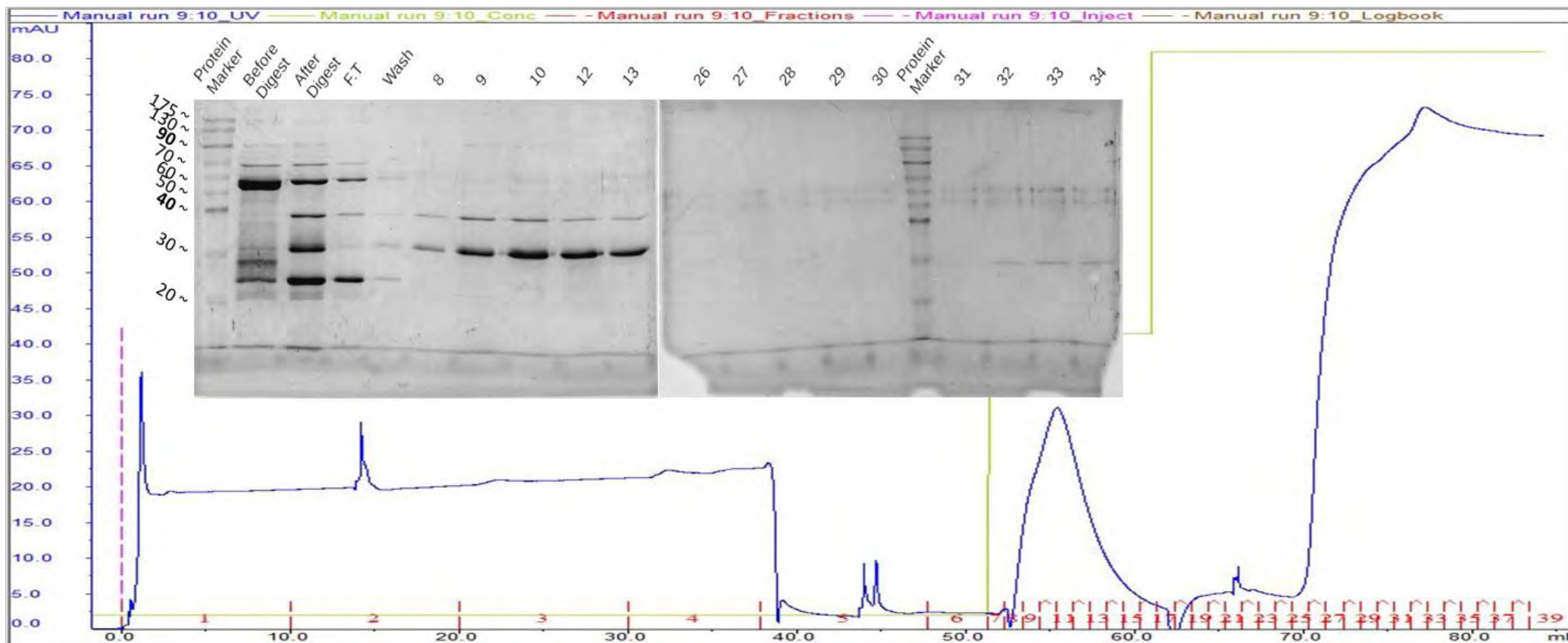
Μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, ακολούθησε χρωματογραφικός καθαρισμός με τη στήλη GST/4B που φέρει ως προσδέτη την ακινητοποιημένη γλουταθειόνη. Παρακάτω φαίνεται το χρωματογράφημα που προέκυψε καθώς και η γέλη πολυακρυλαμιδίου για τον έλεγχο της καθαρότητας της πρωτεΐνης. Στην **εικόνα 2** φαίνεται το χρωματογράφημα και η γέλη πολυακρυλαμιδίου που προέκυψαν μετά το πρώτο στάδιο της απομόνωσης. Τα κλάσματα 1-3 αντιστοιχούν στο σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη, το κλάσμα 4 αντιστοιχούν οι πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκπλυσης και τα κλάσματα 5-12 αντιστοιχούν στο στάδιο έκλουσης όπου έγινε και η έκλυση της γ-PhK. Μετά το τέλος της έκλουσης λαμβάνεται δείγμα για να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Το μοριακό βάρος της γ-phk είναι 34 kDa.

2^η χρωματογραφία συγγένειας

Τα κλάσματα 5-12 που συλλέχθηκαν από την προηγούμενη στήλη υπέστηκαν διάσπαση του επιτόπου της GST με την πρωτεάση 3C. Το πρωτεϊνικό διάλυμα ακολούθως υφίσταται επιπλέον καθαρισμό μέσω της στήλης Hi-Trap Blue HP που φέρει ως προσδέτη τον Cibacron Blue και η έκλυση έγινε με 2 M NaCl. Στην **εικόνα 3** φαίνεται το χρωματογράφημα και η γέλη πολυακρυλαμιδίου που προέκυψαν μετά το δεύτερο στάδιο της απομόνωσης. Τα κλάσματα 1-4 αντιστοιχούν στο σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη και τα κλάσματα 5, 6 αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσής της. Τα κλάσματα 8-34 αντιστοιχούν στο στάδιο της έκλουσης.



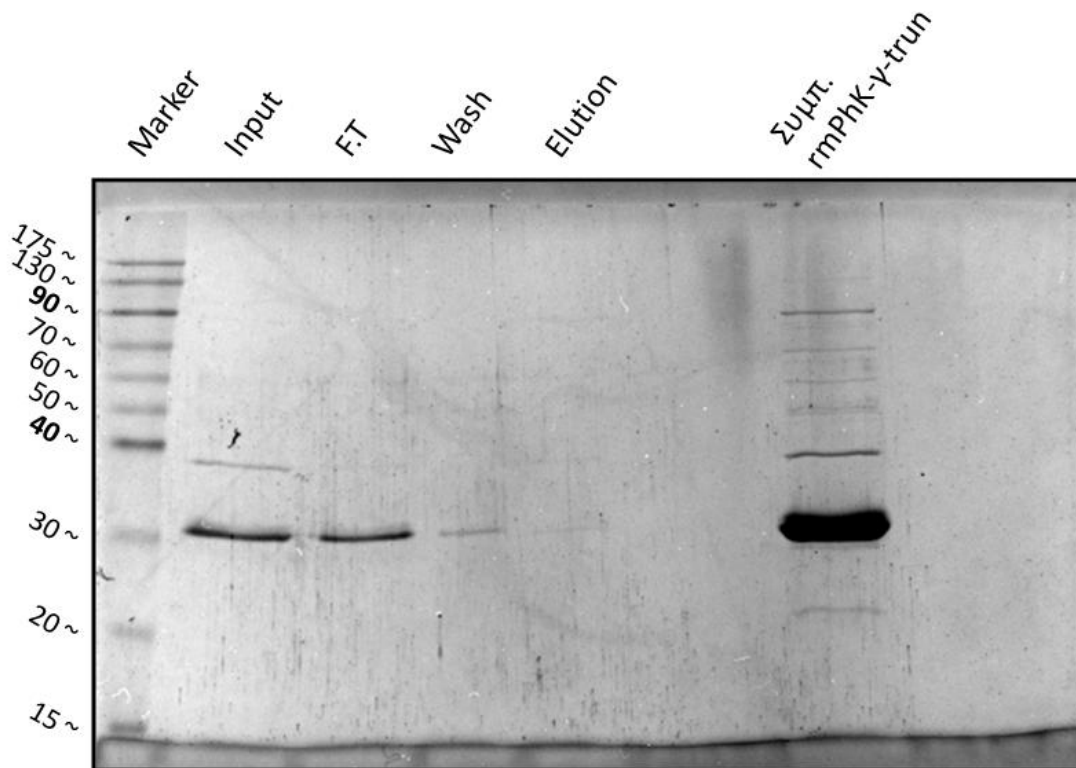
Εικόνα 2: Αρχικά φαίνεται το χρωματογράφημα της στήλης GST/4B. Με μπλε χρώμα είναι η γραμμή που αντιστοιχεί στη τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm και με κόκκινο φαίνεται ο αριθμός των κλασμάτων έκλουσης. Στο κέντρο φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 12 % (w/v) πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί στο σύνολο των πρωτεϊνών μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη διαδρομή φαίνεται το σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που πρόκειται να καθαρισθεί μέσω αυτής της στήλης. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη (κλάσματα 1-3). Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την έκπλυση της στήλης (κλάσμα 4). Στις υπόλοιπες τρεις διαδρομές φαίνεται το έκλουσμα της στήλης (κλάσματα 5, 7 και 8).



Εικόνα 3: Αρχικά φαίνεται το χρωματογράφημα της στήλης Hi-Trap Blue HP. Με μπλε χρώμα είναι η γραμμή που αντιστοιχεί στη τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm και με κόκκινο φαίνεται ο αριθμός των κλασμάτων έκλουσης. Στο κέντρο φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 12 % (w/v) πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Στην πρώτη γέλη αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας, η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί στο πρωτεϊνικό διάλυμα πριν την πέψη με την πρωτεάση και η δεύτερη διαδρομή στο πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την πέψη και. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη (υπερδιήθημα) και αντιστοιχεί στα κλάσματα 1-4. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την έκπλυση της στήλης που αντιστοιχεί στα κλάσματα 5 και 6. Στις υπόλοιπες διαδρομές εμφανίζονται τα εκλούσματα της στήλης 8, 9, 10, 12 και 13. Στη δεύτερη γέλη εμφανίζονται τα υπόλοιπα κλάσματα 26-34 και τον μάρτυρα.

3^η χρωματογραφία συγγένειας

Τα κλάσματα 8-14 που προκύπτουν από την προηγούμενη στήλη συλλέχθηκαν και ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία βαρύτητας με τη στήλη GST-beads agarose. Στην **εικόνα 4** φαίνεται η γέλη πολυακρυλαμιδίου μετά το τελευταίο στάδιο της απομόνωσης. Μετά το τέλος του χρωματογραφικού καθαρισμού φυγοκεντρούνται τα κλάσματα που ανήκουν στο Flow Throug σε 4000 g για 2 λεπτά στους 4°C, μετά από κάθε φυγοκέντρηση συλλέχθηκε περίπου 1 ml Buffer A. Έτσι, συμπυκνώθηκε η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει χρησιμοποιώντας φίλτρο συμπύκνωσης nivaspin 4 με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους 10 kDa. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford και ήταν 1.8 mg/ml.



Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση γέλης 12 % (w/v) πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στο τρίτο βήμα της απομόνωσης με τη στήλη GST-beads agarose. Η πρώτη διαδρομή αντιστοιχεί στον μάρτυρα, η δεύτερη αντιστοιχεί στο σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που πρόκειται να καθαριστεί μέσω αυτής της στήλης (8-14 κλάσματα από την προηγούμενη χρωματογραφία – Input), η τρίτη αντιστοιχεί στο σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη (εκεί είναι η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) (Flow Throug), η τέταρτη αντιστοιχεί στο πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την έκπλυση της στήλης (Wash) και η πέμπτη αντιστοιχεί στην έκλυση του πρωτεϊνικού διαλύματος που γίνεται με το Buffer B (Elution). Η τελευταία διαδρομή αντιστοιχεί στην γ-ρhk μετά το τέλος της απομόνωσης και της συμπύκνωσης του δείγματος.

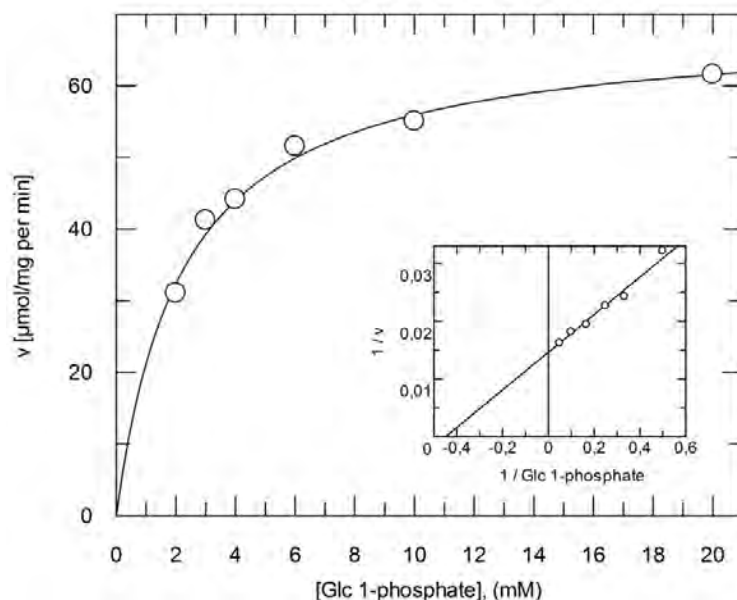
Ποσοτική ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης

Για τη συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης των κλασμάτων έκλουσης χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική μέθοδος Bradford. Κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, στην οποία αντιστοιχίζονται τιμές οπτικής απορρόφησης στα 595 nm με τιμές περιεκτικότητας (mg/ml).

Η εξίσωση ευθείας η οποία προκύπτει, είναι της μορφής $OD_{595nm} = 0.869 C + 0.015$, $R=0.99$ όπου OD_{595nm} αντιπροσωπεύει την οπτική απορρόφηση στα 595 nm, C την περιεκτικότητα και R είναι ο συντελεστής προσαρμοστικότητας ο οποίος αποτελεί δείκτη για την ποιότητα της ευθείας η οποία έχει χαραχθεί. Λύνοντας την εξίσωση ως προς C, προκύπτει: $C = (OD_{595nm} - 0.015) / 0.869$. Βάση της τελευταίας σχέσης είναι δυνατόν να υπολογίσουμε περιεκτικότητες πρωτεϊνικών διαλυμάτων.

Κινητική μελέτη της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPa)

Η κινητική μελέτη είχε ως σκοπό τον προσδιορισμό των σταθερών K_m και V_{max} του ενζύμου. Η σταθερά K_m αποτελεί το μέτρο συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPa) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού είναι μεταξύ 1.0 και 2.5 mM. Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=2.2269 \pm 0.2405$ mM και $V_{max}=68.4361 \pm 1.9314$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας.



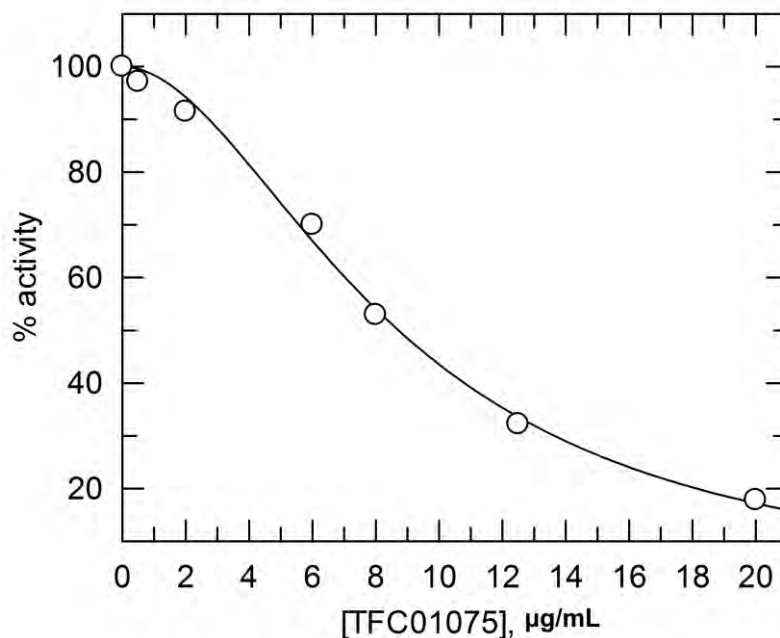
Διάγραμμα 1: Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος.

Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων στη δράση του ενζύμου GPa

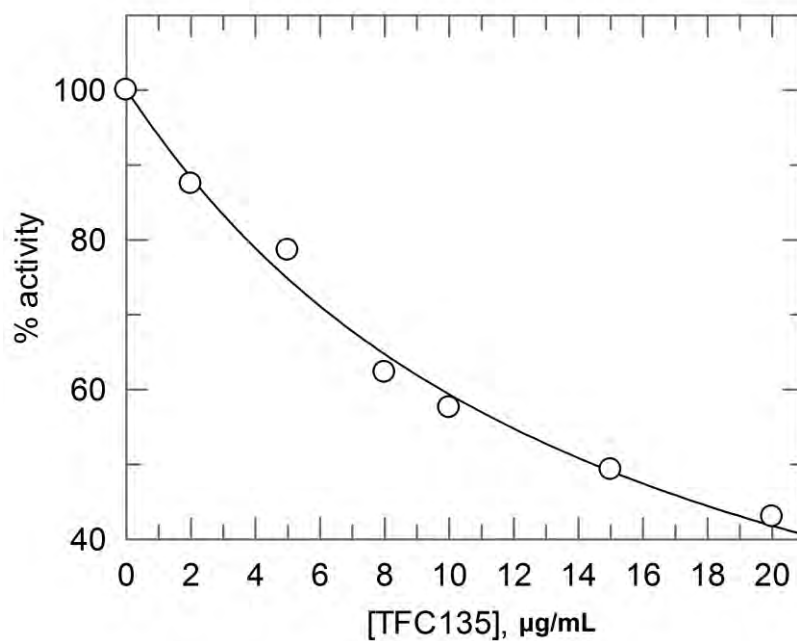
Σκοπός της παρούσας εργασία ήταν η αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν μετά από επεξεργασία με το πρόγραμμα Graft.

Πίνακας 1: Όνομα του φυτικού εκχυλίσματος και η τιμή της IC₅₀.

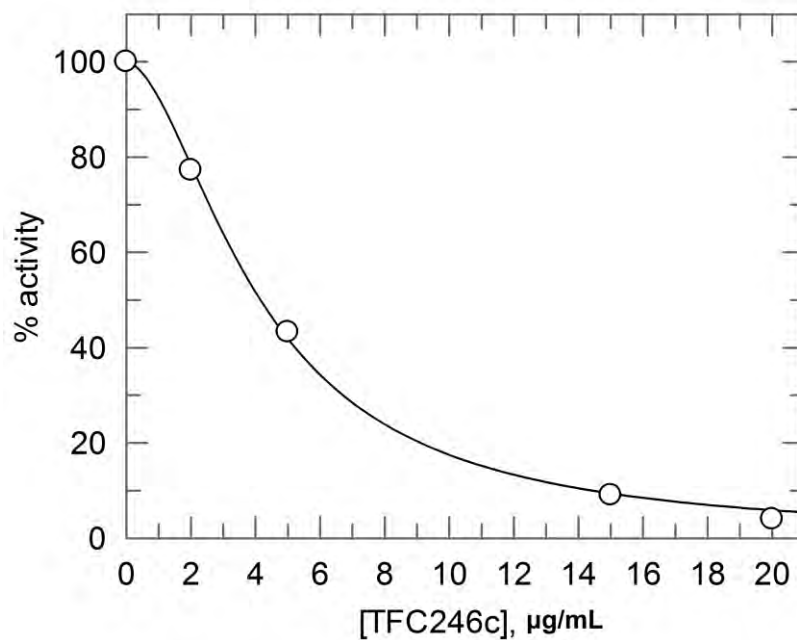
Όνομα δείγματος	IC ₅₀ (μg/ml)
TFC01075	9.12 ± 0.35
TFC0135	14.47 ± 0.70
TFC246c	4.15 ± 0.11
TFC250b	12.49 ± 0.46
TFC250c	1.79 ± 0.08
UPO92	2.80 ± 0.13
UPO92b	5.79 ± 0.26
UPO92c	2.06 ± 0.11
UPO110b	18.38 ± 0.74
UPO110c	17.77 ± 0.17



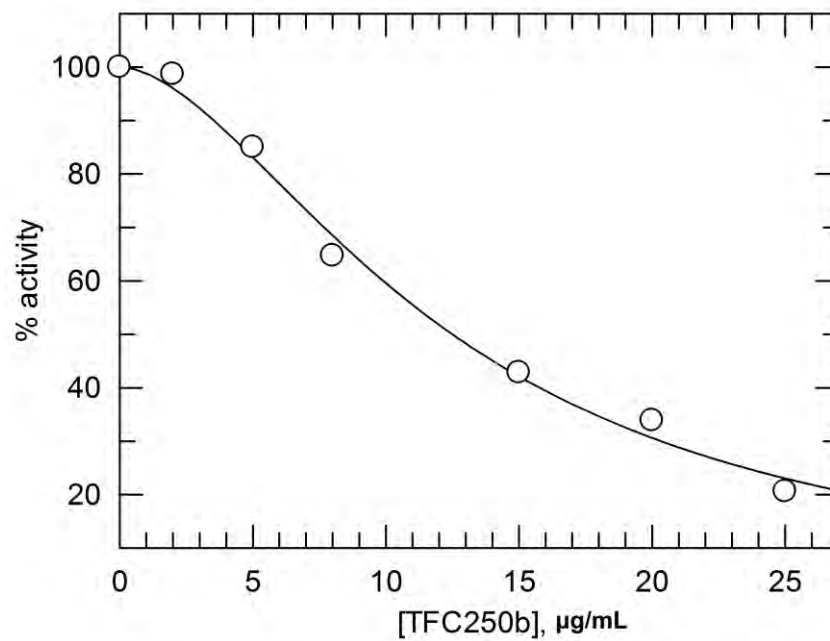
Διάγραμμα 2: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPa ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος TFC01075 στις συγκεντρώσεις 1 μM , 2 μM , 6 μM , 8 μM , 12.5 μM , 20 μM .



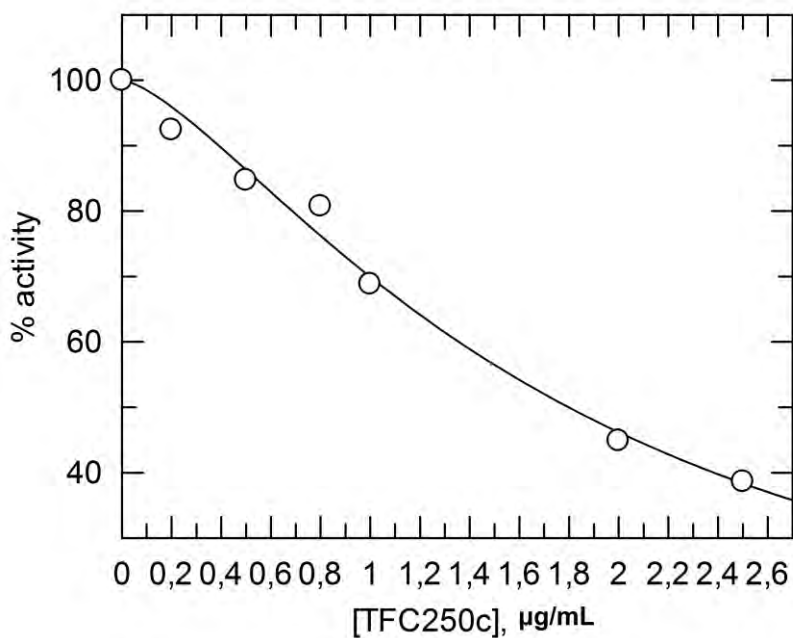
Διάγραμμα 3: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPa ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος TFC135 στις συγκεντρώσεις 2 μM , 5 μM , 8 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM .



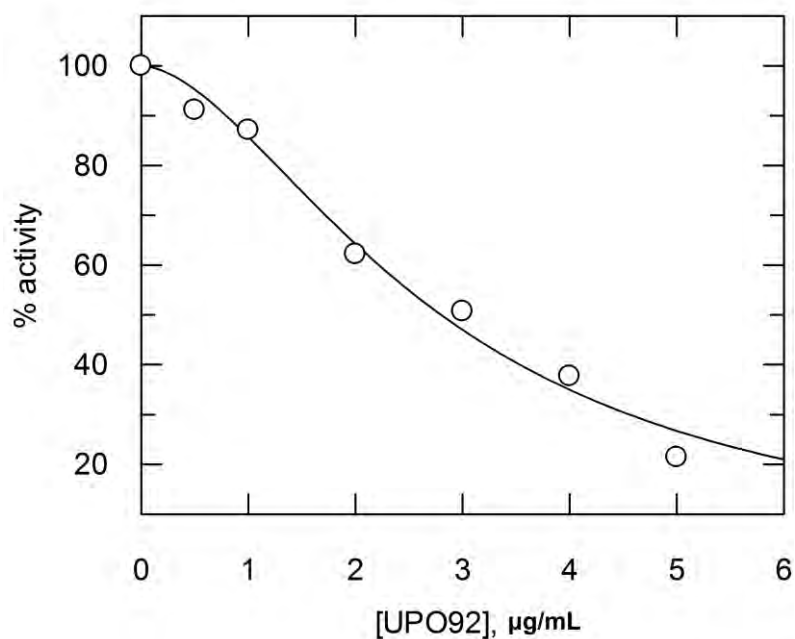
Διάγραμμα 4: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος TFC246c στις συγκεντρώσεις 2 μM , 5 μM , 15 μM , 20 μM .



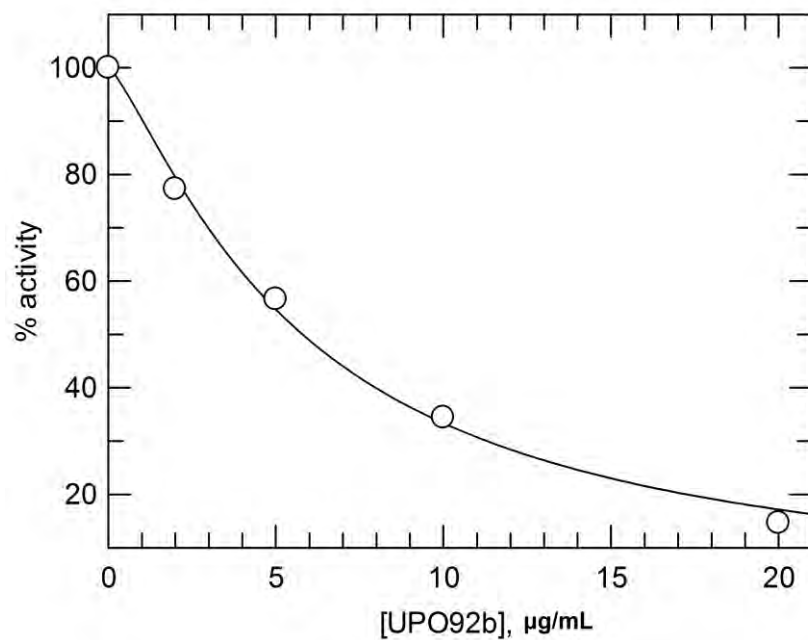
Διάγραμμα 5: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος TFC250b στις συγκεντρώσεις 2 μM , 5 μM , 8 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM .



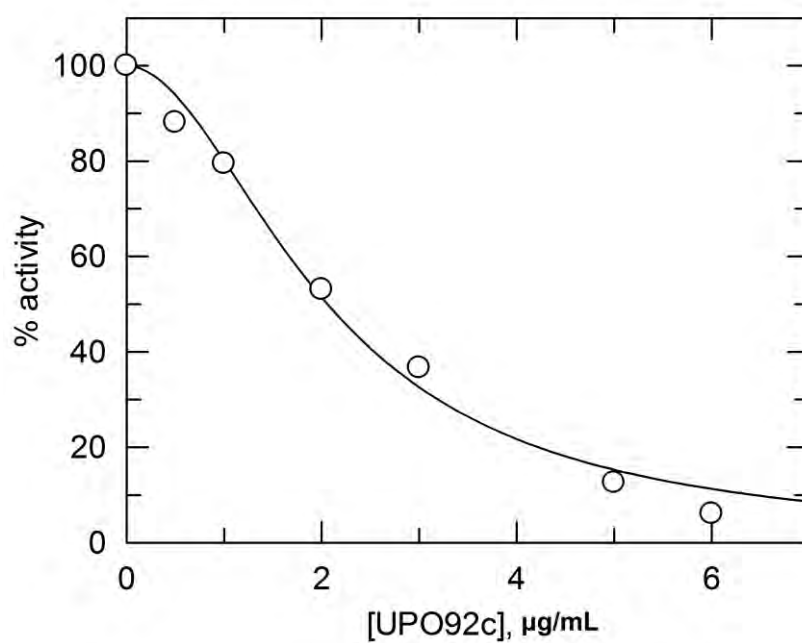
Διάγραμμα 6: Καμπύλη της δραστηρότητας της GPa ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος TFC250c στις συγκεντρώσεις 0.2 μM , 0.5 μM , 0.8 μM , 1 μM , 2 μM , 2.5 μM .



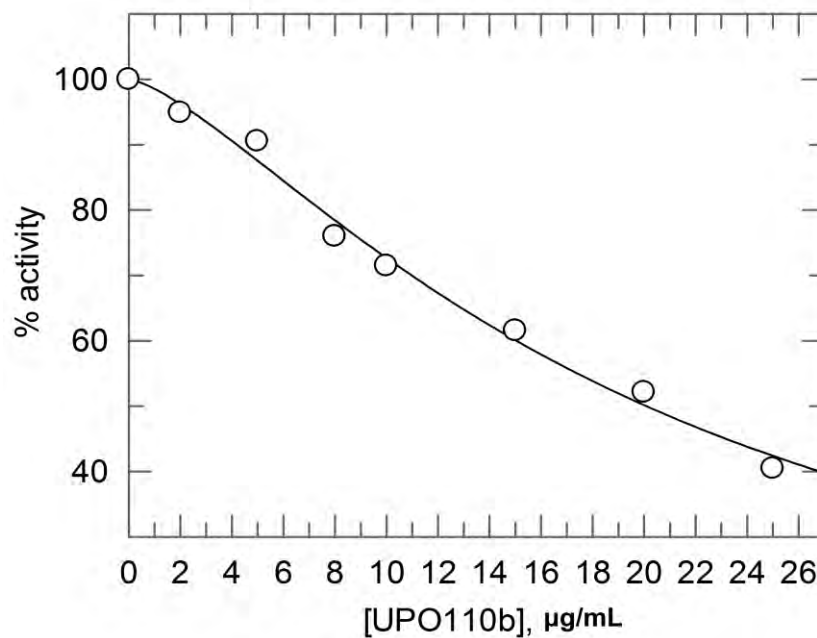
Διάγραμμα 7: Καμπύλη της δραστηρότητας της GPa ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος UPO92 στις συγκεντρώσεις 0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM .



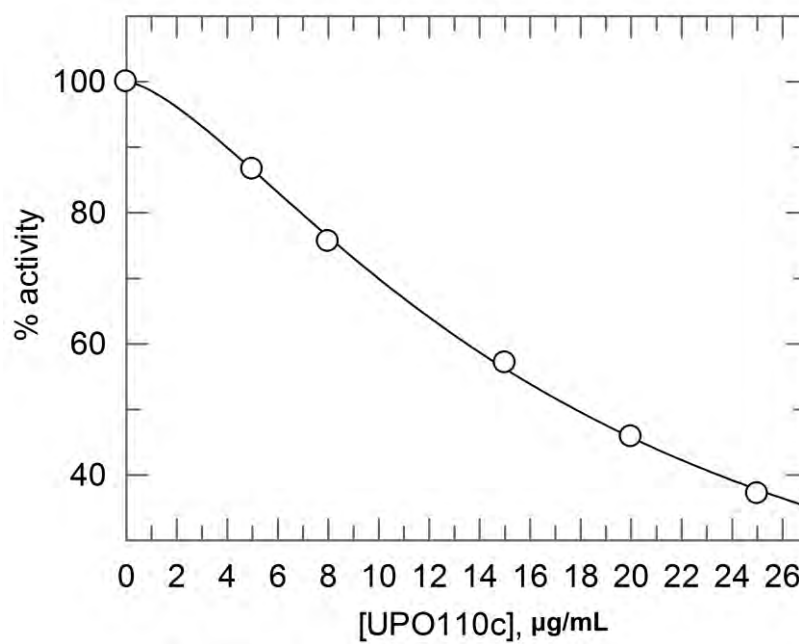
Διάγραμμα 8: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος TFC250b στις συγκεντρώσεις 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM.



Διάγραμμα 9: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος UPO92c στις συγκεντρώσεις 0.5 µM, 1 µM, 2 µM ,3 µM, 5 µM, 6 µM.



Διάγραμμα 10: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος UPO110b στις συγκεντρώσεις 2 μM , 5 μM , 8 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM .



Διάγραμμα 11: Καμπύλη της δραστηριότητας της GPα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος UPO110c στις συγκεντρώσεις 5 μM , 8 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM .

Η κινητική μελέτη έδειξε ότι ορισμένα από αυτά τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% (IC_{50}), σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν δείχνουν ικανά να αναστείλουν τη GPa, με τους αναστολείς TFC250c, UPO92, UPO92b, UPO92c, TFC246c, TFC01075 να εμφανίζουν αναστολή με $IC_{50} < 10$ $\mu\text{g/mL}$, και να αποτελεί τα πλέον ισχυρά βιοενεργά μόρια από αυτά τα εκχυλίσματα ικανά να αναστείλουν τη γλυκογονόλυση (*Kantsadi A.L. et al., 2014*). Οι αναστολείς TFC0135, TFC250b, UPO110b, UPO110c βρέθηκαν να έχουν $IC_{50} > 10$ $\mu\text{g/mL}$, γεγονός που δηλώνει επίσης ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP).

Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδων κρυσταλλογραφίας, των παραπάνω εκχυλισμάτων, για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, θα μας βοηθήσει να ταυτοποιήσουμε τις βιοδραστικές ουσίες αυτών των εκχυλισμάτων καθώς και τα κέντρα σύνδεσής τους στο ένζυμο, με αποτέλεσμα την αναστολή του. Τέλος, με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας θα μπορέσουμε να μελετήσουμε το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης και των εκχυλισμάτων και να οδηγηθούμε στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγένειας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης και σύνθεσης του γλυκογόνου στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, όμως απαιτούνται και περαιτέρω μελέτες *in vivo* για επιβεβαίωση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι μία χρόνια μεταβολική διαταραχή που επηρεάζει περισσότερους από 415 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη και αποτελεί ένα φαρμακευτικό στόχο για την ανακάλυψη νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων. Στην παρούσα έρευνα αξιολογήθηκε η ανασταλτική δράση δέκα εμπλουτισμένων σε τριτερπένια φυτικών εκχυλισμάτων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου α.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes is a severe chronic metabolic disorder affecting more than 415 million people worldwide, characterized by elevated blood glucose levels. Glycogen phosphorylase (GP) catalyzes the glycogen degradation to glucose-1-phosphate and it is a validated molecular target for the development of new hypoglycemic agents. In the presented Thesis the inhibitory potency of ten phytogenic extracts rich in triterpenes against glycogen phosphorylase a has been evaluated by kinetic experiments.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική:

Stryer L. (1997) Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Ξένα:

Aiston S., B. Andersen and L. Agius (2003) Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase, *Diabetes* 52(6):133-1339.

Alberti G., Zimmet P., Shaw J., Bloomgarden Z., Kaufman F and Silink M., (2004), Type 2 diabetes in young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop, *Diabetes Care* 27 (7):1798-1811.

Barford D., Hu S. h. and Johnson L.N. (1989) The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.

Board A.T., Bollen M., Stalmans W., Kim Y., Fleet G.W.J. and Johnson L.N. (1995) Effects of a C1 substituted analogue on the activation states of glycogen synthase and glycogen phosphorylase in rat hepatocytes, *Biochem J.* 311,845-852.

Bollen M., Keppens S., and Stalmans W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver, *Biochem J* 336(Pt 1):1931.

Cohen P. (1973) The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase and the molecular basis of its activation reactions, *Eur J Biochem* 34(1):1-14.

Cohen P. (1983) Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol* 99:243-250.

Cohen P. (1983) Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle, *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci* 302(1108):13-25.

Cori C.F. and Cori G.T. (1936) Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate monoester, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 34:702-705.

Cori C.F. and N.B. Mdsen (1956) The interaction of muscle phosphorylase with p-chloromercuribenzoate. I. Inhibition of activity and effect on the molecular weight, J. Biol Chem 223(2):1055=1065.

Custódioa L., J.Patarraa, F. Alberíciob, N. Nengf, J Florêncio Nogueiraf, A. Romanoa (2015) Phenolic composition, antioxidant potential and in vitro inhibitory activity of leaves and acorns of *Quercus suber* on key enzymes relevant for hyperglycemia and Alzheimer's disease, Volume 64, Pages 45–51.

Dey L., J.T. Xie, A. Wang, J. Wu, S.A. Maieckar, C.S. Yuan. Anti-hyperglycemic effects of ginseng: Comparison between root and berry. *Phytomedicine*, 10 (2003), pp. 600–605.

Dombradi V. (1981) Structural aspects of the catalytic and regulatory function of glycogen phosphorylase, *Int J Biochem* 13(2):125-139.

Fatima N., Hafizur, R.M., Hameed, A. et al. *Eur J Nutr* (2015). Ellagic acid in *Embllica officinalis* exerts anti-diabetic activity through the action on β -cells of pancreas, doi:10.1007/s00394-015-1103-y.

Formagio A., C. Volobuff, M. Santiago, C. Cardoso, M. Vieira, Z. Pereira (2014) Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in *Psychotria* Leaf Extracts, 3(4): 745–757.

Gibbons B.J., Roach P.J., Hurley T.D. (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin, *J Mol Biol* 319(2):463-477.

Hayes J.M. , V.T. Skamnaki, G. Archontis, C. Lamprakis, J. Sarrou, N. Bischler, et al., Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: the role of water molecules examined, *Proteins* 79 (2011) 703–719.

Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, Paulus E, Herling AW, Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J Med Chem.* (1997) Jan 17; 40(2):137-45.

Johnson L.N., Madsen N.B., L. Mosley and K.S. Wilson (1974) The crystal structure of phosphorylase beta at 6 Å resolution, *L Mol Biol* 90(4):703-717

Kantsadi, A.L, J.M. Hayes, S. Manta, V.T. Skamnaki, C. Kiritsis, A.M. Psarra, Z. Koutsogiannis, A, Dimopoulou, S. Theofanous, N. Nikoleousakos, P. Zoumpoulakis, P.

Papadopoulos, S.E. Zographos, D. Komiotis and D.D. Leonidas (2012) The binding of C5-alkynyl and alkylfurano[2,3-d]pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b: synthesis, biochemical and biological assessment, *Eur J Med Chem* 54:740-749

Kantsadi, A.L., J.M. Hayes, S. Manta, V.T. Skamnaki, C. Kiritsis, A.M. Psarra, Z. Koutsogiannis, A. Dimopoulou, S. Theofanous, N. Nikoleousakos, P. Zoumpoulakis, M. Kontou, G. Papadopoulos, S.E. Zographos, D. Komiotis and D.D. Leonidas (2012) The sigma-hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b, *ChemMed* 7(4):722-732

Kantsadi, A.L., A. Apostolou, S. Theofanous, G.A. Stravodimos, E.Kyriakis, V.A. Gorgogietas, D.S. Chatzileontiadou and D.D. Leonidas (2014) Biochemical and biological assesment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase, *Food Chem Toxicol* 67:35-43

Kasvinsky P.J., S. Shechosky and R.J. Fletterick (1978) Synergistic regulation phosphorylase a by glucose and caffeine, *J Biol Chem* 253(24):9102-9106.

Krishnaveni M. and S. Mirunalini, (2011) Therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (amla): the ayurvedic wonder, *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, Volume 21, Issue 1, Pages 93–105.

Kyriakis E., G.A. Stravodimos, A.L. Kantsadi, D.S.Chatzeleontiadou, V.T. Skamnaki and D.D. Leonidas (2015) Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b, *FEBS Lett* 589(15):1787-1794.

L. Jun, W. Xue, C. Yu-Peng, M.Li-Fei, S. Jing, S. Hong-Bin, Z. Lu-Yong (2014) Maslinic acid modulates glycogen metabolism by enhancing the insulin signaling pathway and inhibiting glycogen phosphorylase, *12(4): 0259–0265*.

Leatherbarrow R.J., (1990) GraFit Version 3.0, Erithakus Software. Staines, UK.

Leonidas D.D., N.G. Oikonomakos and A.C Papageorgiou (1991) Sulphate activities phosphorylase b by binding to the Ser (P) site, *Biochim Biophys Acta* 1076(2):305-307.

Leonidas D.D., N.G. Oikonomakos, A.C Papageorgiou and T.g. Sotiroudis (1992) Kinetic properties of tetrameric glycogen phosphorylase b in solution and in the crystalline state, *Protein Sci* 1(9):1123-1132.

Leonidas D.D., N.G. Oikonomakos, A.C Papageorgiou, A Xenakis, C.T. Cazianis and F. Bem (1990) The ammonium sulfate activation of phosphorylase b, *FEBS Lett* 261(1):23-27.

Lowe, E.D., Noble, M.E.M., Skamnaki, V.T., Oikonomakos, N.G., Owen, D.J., and Johnson, L.N. (1997). The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *EMBO J.* 16, 6646–6658.

Maddaiah V.T. and Madsen N.B., 1996, Kinetics of purified liver phosphorylase. *J. Biol Chem.* 241,3873-3881.

Mandal A, Das V, Ghosh P, Ghosh S. (2015) Anti-diabetic Effect of Friedelan Triterpenoids in Streptozotocin Induced Diabetic Rat, PMID: 26669102.

McCirmack J.G., N. Westergaard, M. Kristiansen, C.L. Brand and J. Lau (2001) Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as means of antidiabetic therapy, *Curr Pharm Des* 7(14):1451-1474.

Melpidou A.E. and Oikonomakos N.G., (1983) Effect of glucose 6 phosphate on the catalytic and structural properties of glycogen phosphorylase a. *FEBS Lett.* 154, 105-110.

Mondal TK, Bhattacharya A, Lakshmikumaran M and Ahuja PS (2004) Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 76: 195-254.

Monod J., Wyman J., and Changeux J-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.

Mukhtar H and Ahmad N (1999) Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol. Sci.* 52: 111-117.

Oikonomakos, N.G. (2002) Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3 561–586.

Oikonomakos, N.G., Schnier, J.B., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., and Johnson, L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275 34566–34573.

Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G., and Johnson, L.N. (2000b) A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8 575–584.

Owen, D.J., Noble, M.E.M., Garman, E.F., Papageorgiou, A.C., and Johnson, L.N. (1995). Two structures of the catalytic domain of phosphorylase-kinase: an active protein-kinase complexed with substrate-analog and product. *Structure* 3, 467–482.

Pinostis N., D.D. Leonidas, E.D. Chrysina, N.G. Oikonomakos and I.M. Mavridis, (2003) The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies, *Protein Sci* 12(9):1914-1924.

Rath V.L, M. Ammirati, D.E. Danley, J.L. Ekstrom, E.M. Gibbs, T.R. Hynes, A.M. Mathiowetz, R.K. McPherson, T.V. Olson, J.L. Treadway and D.J. Hoover (2000) Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site, *Chem. Biol.* 7:677-682.

Rath V.L, M. Ammirati, P.K. LeMotte, K.F. Fennell, M.N. Mansour, D.E. Danley T.R. Hynes, G.K. Schulte, D.J. Wasilko and J. Pandit (2000) Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core, *Mol Cell* 6(1):139-148.

Rath V.L., Newgard C.B., Sprang S.R., Goldsmith E.J. and Fletterick R.J. (1987) Modelling the biochemical differences between the rabbit muscle and human liver phosphorylase, *Proteins/Struct.Funct.Genet* 2, 225-235.

Saltiel A.R. and Kahn C.R., 2001, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414(6865):799-806.

Shamim A. Qureshi , Warda Asad and Viqar Sultana (2009) The Effect of *Phyllanthus emblica* Linn on Type - II Diabetes, Triglycerides and Liver - Specific Enzyme, *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (2): 125-128 ISSN 1680-5194.

Skamnaki V.T. , D.J. Owen, M.E.M. Noble, E.D. Lowe, G. Lowe, N.G.Oikonomakos, et al.(1999) Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies, *Biochem. -US* 38 14718–14730.

Somsák L., Czifrák K., Tóth M., Bokor E., Chrysina E.D., Alexacou K.M., Hayes J.M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D.D., Zographos S.E., Oikonomakos N.G. (2008) New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents, *15(28):2933-83*.

Stryer L., Berg J.M., Tymoczko L.J. (2002) Biochemistry, W.H. Freeman.

Suryanarayana P, Kumar PA, Saraswat M, Petrash JM, Reddy GB (2004) Inhibition of aldose reductase by tannoid principles of *Emblica officinalis*: implications for the prevention of sugar cataract. *Mol Vis* 10: 148–154.

Vénien-Bryan C., S. Jonic, V. Skamnaki, N. Brown, N. Bischler, N.G. Oikonomakos, N.Boisset and L.N. Johnson¹, (2009) The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase, 17(1): 117–127.

Wang, J.H., Shonka M.L. and Graves D.J. (1965) Influence of carbohydrates on phosphorylase structure and activity. I. Activation by preincubation with glycogen. *Biochemistry*, 11, 2296-2301.

Wang, J.H., Shonka M.L. and Graves D.J. (1965) The effect of glucose on the sedimentation and catalytic activity of glycogen phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 131-135.

Weisburger JH (1997) Tea and health: A historical perspective. *Cancer Lett.* 114: 315-317.

Wen X., H. Sun, J. Liu, K. Cheng, P. Zhang, L. Zhang, J. Hao, P. Ni, S.E.Zografos, D.D. Leonidas, K.M. Alexacou, T. Gimisis, J. M. Hayes and N.G. Oikonomakos (2008) Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships and X-ray crystallographic studies. *J Med Chem* 51(12):3540-3554.

Young-Rye K., Hak-Yong L., Jung-Hoon K., Dea-In M., Min-Young S., Sang-Hoon P., Kwang-Ho C., Chang-Ryong K., Sang-Hyun K., Ji-Hyu O., Seong-Wan C., Sun-Young K., Min-Gul K., Soo-Wan C., Okjin K., and Hong-Geun O. (2012) Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet, 28(1): 23–29.